

Assoziation zwischen dem Nachweis von thrombozytären Autoantikörpern und
Schweregrad der Immunthrombozytopenie

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

vorgelegt von Michelle Reich
aus Düsseldorf

Gießen 2023

Assoziation zwischen dem Nachweis von thrombozytären Autoantikörpern und
Schweregrad der Immunthrombozytopenie

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

vorgelegt von Michelle Reich
aus Düsseldorf

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Aus dem Institut für Klinische Immunologie, Transfusionsmedizin und Hämostaseologie

Gutachter/in: Prof. Dr. Bein

Gutachter/in: Frau PD Dr. Neumann

Tag der Disputation: 14.11.2023

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Definition und Ätiologie	1
1.2	Epidemiologie	2
1.3	Pathogenese.....	2
1.4	Klinik und Verlauf.....	7
1.5	Diagnostik und Differentialdiagnosen	9
1.6	Therapie.....	13
1.7	Thrombozytäre Glykoproteine.....	16
1.7.1	Aufbau	17
1.7.2	Funktion der Glykoproteinkomplexe GP Ib/IX/V und GP IIb/IIIa.....	20
1.8	Fragestellung	22
2.	Material und Methoden	25
2.1	Patientenkollektiv und Datenerhebung	25
2.2	Labormethoden.....	26
2.2.1	monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA).....	27
2.2.2	Platelet Immunofluorescence Test (PIFT).....	31
2.3	Statistische Methoden.....	32
2.4	Ethikvotum	33
3.	Ergebnisse	34
3.1	Patientendaten.....	34
3.1.1	Kohorten und Gruppen	34
3.1.2	Demographische Daten	34
3.1.3	Thrombozytenzahl: Häufigkeitsverteilung.....	37
3.2	Direkter MAIPA	42
3.2.1	Betrachtung einzelner Glykoproteine.....	43
3.2.2	Sensitivität und Spezifität.....	49
3.2.3	Kombination mehrerer Glykoproteine	51
3.3	Indirekter MAIPA.....	57
3.3.1	Betrachtung einzelner Glykoproteine.....	57

3.3.2	Sensitivität und Spezifität.....	64
3.3.3	Kombination mehrerer Glykoproteine	66
3.4	Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT).....	72
3.4.2	Sensitivität und Spezifität.....	74
3.5	Kombination direkter und indirekter MAIPA.....	75
3.6	Kombination direkter MAIPA und PIFT	82
4.	Diskussion.....	86
4.1	Einordnung der Zusammensetzung des Patientenkollektivs	86
4.2	ITP-Patientenkollektiv	86
4.3	Direkter MAIPA	87
4.3.1	Stellung des direkten MAIPA in der Diagnostik der ITP	87
4.3.2	Nachweis thrombozytärer Antikörper gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V ..	88
4.4	Indirekter MAIPA.....	91
4.4.1	Nachweis freier Antikörper gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/Ia	91
4.5	Kombination direkter und indirekter MAIPA.....	94
4.6	Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT).....	94
4.7	Sensitivität & Spezifität	96
4.8	Bedeutung für die Klinik.....	97
4.9	Schwächen der Arbeit.....	99
5.	Zusammenfassung.....	101
6.	Summary.....	102
7.	Literaturverzeichnis	104
8.	Anhang.....	116
8.1	Abkürzungsverzeichnis	116
8.2	Abbildungsverzeichnis	119
8.3	Tabellenverzeichnis	121
8.4	Weitere Ergebnisse.....	123
8.5	Danksagung.....	124
8.6	Ehrenwörtliche Erklärung.....	125

Das in dieser Arbeit gewählte generische Maskulinum bezieht sich zugleich auf die männliche, die weibliche und andere Geschlechteridentitäten. Zur besseren Lesbarkeit wird auf die geschlechtsspezifische Schreibweise, sowie auf eine Mehrfachbezeichnung verzichtet. Alle Geschlechteridentitäten werden ausdrücklich mitgemeint, soweit die Aussage dies erfordert.

1. Einleitung

1.1 Definition und Ätiologie

Die Immunthrombozytopenie (ITP) ist eine erworbene Thrombozytopenie, welche durch eine Autoimmunreaktion gegenüber Thrombozyten und Megakaryozyten hervorgerufen wird. Sie ist durch eine isolierte Thrombozytopenie charakterisiert und kann mit einer erhöhten Blutungsneigung einhergehen [59, 87]. Das Eponym Morbus Werlhof geht auf den Arzt Paul Gottlieb Werlhof (1699–1767) zurück. Sein Bericht einer Patientin mit postinfektiösen Blutungen der Haut und Schleimhäute (Morbus maculosus haemorrhagicus) im Jahr 1735 gilt als meistzitierte Erstbeschreibung der ITP [42, 59]. Rudolf Dohrn, Professor der Geburtshilfe an der Universität Marburg, beschrieb 1874 den ersten Fall eines „Morbus maculosus Werlhofii übertragen von der Mutter auf die Frucht“, im Rahmen dessen Mutter und Kind eine Immunthrombozytopenie mit Purpura entwickelten [23].

Eine andere alte Bezeichnung der ITP ist die ‚idiopathische thrombozytopenische Purpura‘. Diese sollte nicht mehr benutzt werden, da die ursächliche Dysregulation des Immunsystems nicht mehr als „idiopathisch“ (griech. *ídios páthos* = Erkrankung ohne fassbare Ursache) bezeichnet werden kann und die ITP auch sekundär im Rahmen anderer Erkrankungen auftreten kann [42, 91]. Zudem haben viele Patienten keine Purpura, sondern lediglich erniedrigte Thrombozytenzahlen [59]. Daher ist die allgemein verwendete Bezeichnung der ITP heute die ‚Immunthrombozytopenie‘ [91].

Die Einteilung der ITP erfolgt anhand der Dauer und Ätiologie der Erkrankung (*siehe* Tabelle 1). Zu unterscheiden ist die primäre Form (ca. 80 %), bei der keine Ursache erkennbar ist, von den sekundären Formen (ca. 20 %), die im Rahmen anderer immunologisch bedingter Krankheiten, maligner Erkrankungen, durch Medikamente und bei bzw. nach Infektionen auftreten können [16, 42, 59].

Die früher verwendete Klassifikation der ITP in eine akute und eine chronische Form wurde 2009 zugunsten der folgenden Stadieneinteilung verlassen: neu diagnostizierte, persistierende, chronische ITP (*siehe* Tabelle 1). Anhand des Stadiums kann damit eine gezieltere und einfachere Therapieentscheidung getroffen werden (*siehe* 1.6).

Tabelle 1: Klassifikation der Immunthrombozytopenie (ITP) nach Verlaufsform und Stadium ([16, 42, 54, 59])

Verlaufsform	Ursachen/Erkrankungen
primäre ITP (ca. 80 %)	keine
sekundäre ITP (ca. 20 %)	medikamenteninduzierte ITP Antiphospholipid-Syndrom Immundefizienz-Syndrome Autoimmun Lymphoproliferatives-Syndrom Lymphom (CLL, Hodgkin, u.a.) Evans-Syndrom (ITP + AIHA-WT) SLE nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen Infektionen (HIV, Hep B, Hep C, H. pylori, Varizellen, CMV) Impfungen (z.B. Masern-Röteln-Mumps 1:40.000, SARS-CoV-2)

Stadium	Definition
neu diagnostiziert	< 3 Monate nach Diagnosestellung
persistierend	3 - 12 Monate nach Diagnosestellung
chronisch	> 12 Monate nach Diagnosestellung

1.2 Epidemiologie

Die ITP ist eine seltene Erkrankung. Bei Erwachsenen liegt die Inzidenz bei 0,2-0,4 Neuerkrankungen pro 10.000/Jahr und die Prävalenz bei 0,9–2,6 pro 10.000. Das durchschnittliche Erwachsenenalter liegt bei 50-55 Jahren, ein steigender Trend deutet sich an. Im mittleren Alter erkranken Frauen häufiger; ab ca. dem 60. Lebensjahr Männer [59].

Bei Kindern und Jugendlichen liegt die Inzidenz bei 0,2–0,7 Neuerkrankungen pro 10.000/Jahr, welche im Frühjahr um die Hälfte höher ist als im Sommer. Die Prävalenz liegt bei 0,4–0,5 pro 10.000. Diese ist auf Grund der im Kindesalter seltenen chronischen Verlaufsform der ITP deutlich niedriger als bei den Erwachsenen [59]. Im Kindesalter ist der überwiegende Anteil der Patienten männlich [98].

1.3 Pathogenese

Die Balance zwischen Thrombozytenbildung und Thrombozytenabbau ist bei der ITP durch verschiedene pathogenetische Mechanismen, deren genauer Ablauf bis heute nur teilweise verstanden ist, gestört [58].

Ein Verlust der Immuntoleranz induziert eine Autoimmunreaktion gegenüber Thrombozyten und Megakaryozyten, wodurch es sowohl zu einer erniedrigten, peripheren Thrombozytenzahl als auch zu einer verminderten Thrombozytenbildung im

Knochenmark kommt [59]. Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen könnten molekulare Mimikry mit bakteriellen oder viralen Proteinen ein Grund für die Entstehung dieser Immunreaktion sein [58].

Die heute bekannten, wichtigsten Pathomechanismen, auf die im Folgenden näher eingegangen wird, beinhalten [59]:

- Autoantikörper gegen Thrombozyten
- Thrombozytenschädigung durch T-Lymphozyten
- Hemmung der Thrombozytopoese

Unter physiologischen Umständen wird das Immunsystem durch humorale und zelluläre Komponenten genau reguliert, so wird die Immunantwort durch B- und T-Lymphozyten u.a. durch regulatorische Zellen (B reg, T reg) gehemmt. Veränderungen dieser Immunzellen tragen wesentlich zur Pathogenese der ITP bei [58].

Die Experimente von Harrington et al. und Shulman et al. brachten die ersten Erkenntnisse, dass gegen Thrombozyten gerichtete Autoantikörper eine wichtige Rolle bei der Entstehung der ITP spielen. Harrington et al. induzierten bei gesunden Personen eine Thrombozytopenie durch die Gabe des Plasmas von ITP-Patienten [33]. Die Identifikation des Autoantikörpers als auslösenden Faktor gelang Shulman et al. in der Gammaglobulinfraktion [100]. Die von B-Lymphozyten produzierten Autoantikörper sind hauptsächlich vom Typ IgG, selten auch vom Typ IgM oder IgA, die jedoch meist nur in Kombination mit IgG vorkommen und in der Pathogenese eine untergeordnete Rolle spielen [34, 45]. Die Autoantikörper binden an Thrombozytenoberflächenproteine. Dazu gehören die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa (Fibrinogenrezeptor) und GP Ib/IX, welche derzeit als Hauptzielstrukturen der ITP gelten (*siehe 1.7*). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen das Glykoprotein GP V, welches Teil des von-Willebrand-Rezeptors (GP Ib/IX/V) ist, ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese der ITP spielen [113]. Oft haben ITP-Patienten Autoantikörper gegen mehrere dieser Antigene gleichzeitig [44]. Thrombozytäre Autoantikörper weiterer identifizierter Zielstrukturen, wie die Kollagenrezeptoren GP Ia/IIa, GP IV oder das Glykoprotein GP VI, sind selten isoliert vorhanden und von geringerer Relevanz [8, 86]. Bei 29-90 % der ITP-Patienten können thrombozytäre Autoantikörper nachgewiesen werden [86].

An Thrombozyten gebundene Autoantikörper führen zu deren vermehrtem Abbau (*siehe* Abbildung 1). Über ihre Fc-Domäne können Autoantikörper eine Phagozytose durch Makrophagen und dendritische Zellen in Milz und Leber induzieren. Die Komplementaktivierung und die daraus resultierende Apoptose, sowie die Zelllyse sind

Fc-abhängige Mechanismen der Thrombozytenelimination [58]. Durch die Bindung an die Thrombozytenoberfläche können die Rezeptoren in ihrer Adhäsions- und Aggregationsfunktion eingeschränkt und die Blutungsneigung dadurch zusätzlich verstärkt werden (sog. erworbene Thrombasthenie Glanzmann) (siehe 1.7) [59]. Ein Fc-unabhängiger Mechanismus ist der Abbau der Thrombozyten nach Bindung an Ashwell-Morell-Rezeptoren (AMR) in der Leber. Dieser erkennt gealterte oder geschädigte Thrombozyten anhand ihrer hydrolysierten Sialinsäure-Reste (Desialylation) und filtert sie aus dem Blutstrom heraus [58, 59]. Bei der ITP sind vor allem Autoantikörper gegen das Glykoprotein GP Ib/IX für dessen Desialysierung verantwortlich [55]. Der von Quach et al. gefundene Mechanismus, bei dem Autoantikörper an die ligandenbindende Domäne (LBD) des GP Ib/IX binden und über eine Vernetzung der Rezeptoren einen Thrombozytenabbau induzieren, ist ebenfalls Fc-unabhängig [89]. Bestandteil aktueller Forschung ist eine antikörperinduzierte Apoptose der Thrombozyten, die glykoproteinspezifisch zu sein scheint und bei Patienten mit Anti-GP IIb/IIIa und Anti-GP Ib/IX vorkommt, nicht jedoch bei Patienten mit Anti-GP Ia/IIa [2].

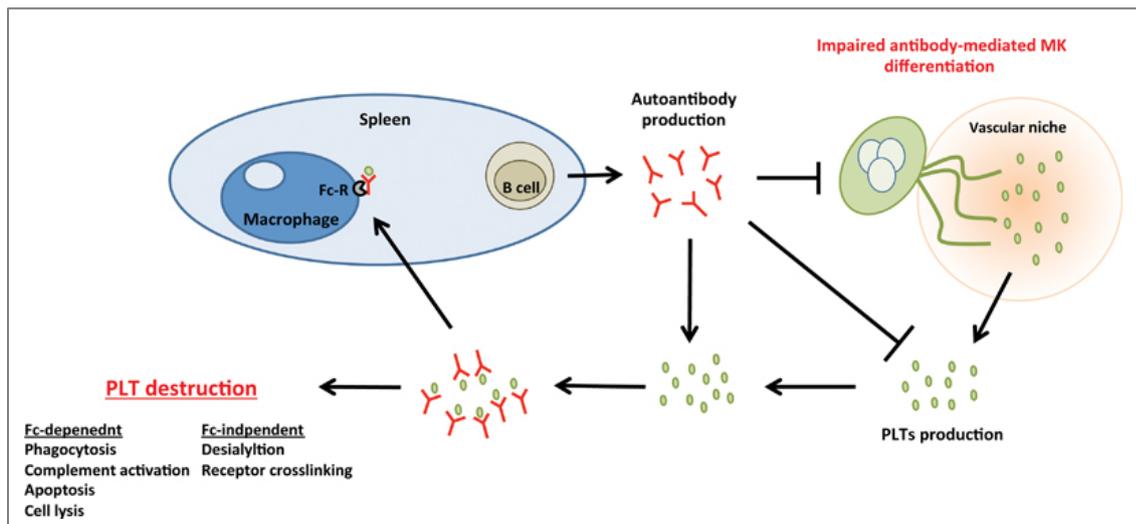


Abbildung 1: Pathomechanismen der Thrombozytenelimination bei Immuntrombozytopenie (ITP)

Bei der Immuntrombozytopenie (ITP) werden die Thrombozyten durch verschiedene Mechanismen abgebaut. B-Lymphozyten produzieren Autoantikörper, die über ihre Fc-Domäne eine Phagozytose, eine Komplementaktivierung mit anschließender Apoptose und eine Zellyse induzieren können. Außerdem gibt es Fc-unabhängige Mechanismen wie die Desialylierung der Glykoproteine, woraufhin die Thrombozyten über Ashwell-Morell-Rezeptoren der Leber abgebaut werden und die Rezeptorvernetzung mit anschließender Thrombozytenelimination. Die Autoantikörper-vermittelte Hemmung der Megakaryozytendifferenzierung führt zu einer verminderten Thrombozytenproduktion. (PLT: platelets; MK: megakaryocytes; Fc-R: Fc-receptor). Mit freundlicher Genehmigung des Thieme Verlags und Prof. Tamam Bakchoul [58].

Lange ging man davon aus, dass die erniedrigten Thrombozytenzahlen ausschließlich durch deren antikörperinduzierten frühzeitigen Abbau entstehen. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass auch die T-Zellen, B-Zellfunktionen neben der

Antikörperproduktion und die geminderte Thrombozytopenie eine wichtige Rolle spielen [2].

Störungen der T-Zellen zeigen sich bei ITP-Patienten in einem erhöhten Th1/Th2-Quotienten (CD4⁺-Lymphozyten) im Blutstrom und in der Milz [2, 78]. Die Th1-Antwort konnte erstmals durch Erhöhung der Zytokine IL-2 und IFN- γ und deren mRNA-Spiegel im Serum, sowie erhöhte intrazelluläre IFN- γ -Spiegel in T-Zellen, festgestellt werden [8, 79]. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Anzahl und Aktivität von zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten mit konsekutiver Zerstörung der Thrombozyten im Blut und Megakaryozyten im Knochenmark [2, 8]. Die Differenzierung und Antikörperproduktion der B-Lymphozyten wird durch folliculäre T-Helferzellen (TFH) der Milz mittels CD40L/CD40-Wechselwirkungen und der Produktion von IL-2 stimuliert [8]. Die Stimulation der B-Zellen kann auch durch Thrombozyten stattfinden, die CD40L (CD154) überexprimieren [103]. Zudem zeigen ITP-Patienten eine verminderte Anzahl und Dysfunktion an regulatorischen T-Zellen in Milz, Blut und Knochenmark [8]. Die physiologischen Fähigkeiten der T-reg-Zellen, wie die Hemmung von Effektorzellen (CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen) und die Toleranz von dendritischen Zellen, sind gestört und die Immunantwort kann nicht mehr adäquat gehemmt werden [8]. Eine Assoziation zwischen der Reduktion der T-reg-Zellzahl und der Schwere der ITP (Blutungen, Thrombozytopenie) konnten Ma et al. zeigen [57]. Kuwana et al. konnten zeigen, dass mesenchymale Stammzellen (MSC) beim Zustandekommen dieser Immundysregulation eine wichtige Rolle spielen. Die Funktionen der MSC dienen der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz [59]. Im Knochenmark von ITP-Patienten konnte eine erhöhte Apoptoserate und verminderte Proliferationsrate der MSC festgestellt werden, wodurch deren Fähigkeit zur Stimulation der T-reg-Zelldifferenzierung und IL-10-Produktion eingeschränkt wird und eine verminderte Inhibition der T-Zellen stattfindet (*siehe* Abbildung 2) [8, 58].

Des Weiteren konnte man bei ITP-Patienten eine erhöhte Anzahl an autoreaktiven B-Lymphozyten feststellen. Die Entstehung und das Überleben dieser ist durch den ‚B-cell activating factor‘ (BAFF) reguliert, welcher bei unbehandelten ITP-Patienten im Serum erhöht war [58]. Dahingegen war die Anzahl der regulatorischen B-Zellen (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}) erniedrigt. Deren physiologische Aufgabe ist die Erhaltung einer peripheren Toleranz, indem die Sekretion von IL-10 zur Rekrutierung und Differenzierung von regulatorischen T-Zellen und der Reduktion der CD4⁺ T-Zellfunktionalität führt [58].

Eine geminderte Megakaryozytopenie und Thrombozytopenie wird bei ITP-Patienten durch verschiedene Mechanismen ausgelöst (*siehe* Abbildung 2).

Wang et al. konnten zeigen, dass die Fähigkeit der MSC zur Differenzierung der Megakaryozyten und der Thrombozytose bei ITP-Patienten eingeschränkt ist [117]. Die Bindung von Autoantikörpern an die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX und an den Thrombopoetinrezeptor (TPO-R) c-Mpl der Megakaryozyten führt zu einer Suppression der Thrombozytose [51, 58]. Durch einen verstärkten Abbau von Thrombozytengebundenem Thrombopoetin in Milz und Leber haben ITP-Patienten einen relativen Mangel an Thrombopoetin, wodurch die Thrombozytose nicht mehr adäquat stimuliert werden kann [59]. Zudem ist die Zahl der Thrombopoetinbindenden Megakaryozyten im Knochenmark erhöht, wodurch der Mangel weiter verstärkt wird [59]. Im Knochenmark von ITP-Patienten konnte eine erhöhte Anzahl von unreifen Megakaryozyten mit veränderten Nuklei und Zytoplasma festgestellt werden [58]. Die Apoptose der Megakaryozyten scheint ein weiterer Pathomechanismus der ITP-Entstehung zu sein, dessen detaillierter Ablauf noch nicht komplett verstanden ist [2].

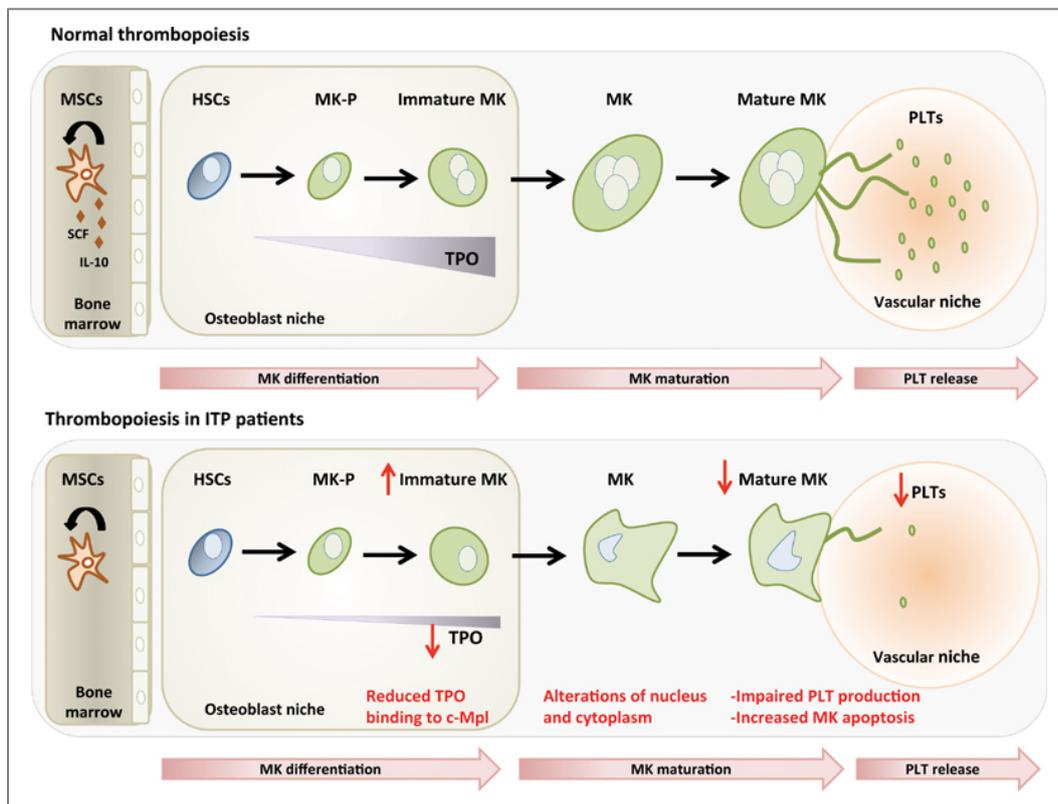


Abbildung 2: Veränderte Thrombozytose bei Immunthrombozytopenie-Patienten (ITP)

Oben: unter physiologischen Umständen induziert Thrombopoetin (TPO) die Differenzierung von hämatologischen Stammzellen (HSCs) zu Promegakaryozyten (MK-P), unreifen Megakaryozyten (MK) und schließlich zu reifen MKs mit ihrem charakteristischen polyplen Nukleus. Diese entwickeln Ausstülpungen mit Prothrombozyten, aus welchen Thrombozyten (PLTs) ins Blut freigesetzt werden. Mesenchymale Stammzellen (MSCs) des Knochenmarks unterstützen den Prozess, indem sie die Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung aufrechterhalten. *Unten:* Bei der Thrombozytose von ITP-Patienten sind verschiedene Schritte des Prozesses, wie in der Abbildung dargestellt, gestört. Mit freundlicher Genehmigung des Thieme Verlags und Prof. Tamam Bakchoul [58].

Jüngere Erkenntnisse zeigen, dass bei milzbetontem Thrombozytenabbau, der vor allem bei der chronischen ITP eine Rolle spielt, eine verminderte Thrombopoetinproduktion vorliegt [8, 59]. Bei der akuten Verlaufsform der ITP findet der Abbau opsonierter Thrombozyten vor allem über Ashwell-Morell-Rezeptoren der Leber statt, wodurch die TPO-Produktion stimuliert wird [69] (siehe Abbildung 3).

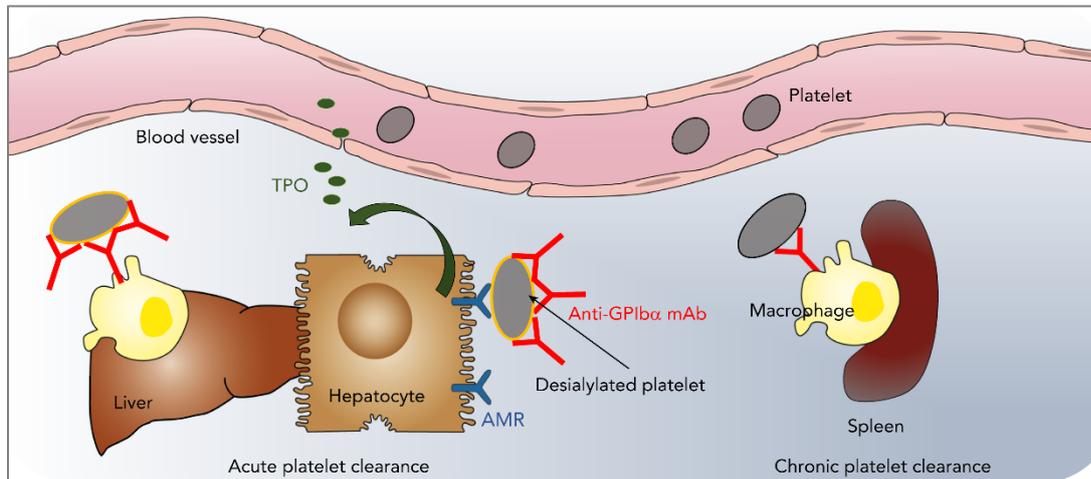


Abbildung 3: Modell der akuten und chronischen antikörpervermittelten Thrombozytenelimination durch Anti-GPII α -Antikörpern

Die hochdosierte Injektion von monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen GPIIb/IIIa, die akute ITP simulierend, führt zu einer Opsonierung, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten, gefolgt von deren schneller Elimination aus dem Blutkreislauf durch Lebermakrophagen und Hepatozyten, vermittelt über Ashwell-Morell-Rezeptoren (AMR). Dadurch wird eine schnelle Thrombopoetinproduktion (TPO) induziert. Die niedrigdosierte Injektion der mAb, die chronische ITP nachahmend, führt zu einer allmählichen Abnahme der zirkulierenden Thrombozytenzahl, die nur durch Makrophagen der Milz abgebaut werden; der TPO-Spiegel bleibt unverändert. Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags. *Illustration von Leonardo Rivadeneira, Versiti Translational Glycomics Center.* [36]

1.4 Klinik und Verlauf

Das klinische Bild der ITP kann sich je nach Alter und Verlaufsform unterschiedlich darstellen [48].

Bei Kindern kommt es häufig zu einem akuten Beginn der Symptome, entsprechend der neuen Klassifikation zur neu-diagnostizierten Verlaufsform (< 3 Monate nach Diagnosestellung, siehe Tabelle 1). In etwa 50-70 % der Fälle geht der ITP ein viraler Infekt (1-2 Wochen vorher) oder eine Impfung (z.B.: MMR-Impfung) voraus [42]. Typisch ist das Auftreten vermehrter Blutungen in Form von Hautblutungen, Petechien vor allem an den Beinen und Hämatomen bei ansonsten klinisch unauffälligem Kind [42, 59]. Ca. 25-30 % der Kinder haben zusätzlich Blutungen und Blutblasen der Mund- und Nasenschleimhaut, 2-3 % davon als schwer eingestuft [13]. Zu zerebralen Blutungen kommt es bei 0,1-0,8 % der Kinder, bei denen 90 % eine schwere Thrombozytopenie mit < $20 \times 10^9/L$ Thrombozyten und 75 % < $10 \times 10^9/L$ Thrombozyten haben [42]. Auch wenn diese selten sind, stellen intrazerebrale Blutungen die Haupttodesursache der ITP dar [15]. Selten bestehen eine Hämaturie, Menorrhagie

oder Darmblutungen [13]. Kürzlich wurde beschrieben, dass okkulte, asymptomatische Blutungen (Mikrohämaturie, positiver Hämoccult/iFOBT, ZNS Mikroblutungen) häufiger vorkommen als bisher angenommen [28, 106]. Untypisch für die ITP sind Gelenkblutungen und ausgedehnte Weichteilblutungen, die eher bei plasmatischen Gerinnungsstörungen wie der Hämophilie auftreten [59]. Durch den verstärkten Blutverlust kann eine mikrozytäre Eisenmangelanämie entstehen [59, 74]. 10 % der neu-diagnostizierten Kinder zeigen gar keine Blutungssymptome [59]. In den meisten Fällen verschwinden die Symptome innerhalb von einer Woche bis zu drei Monaten ohne schwerwiegende oder lebensbedrohliche Blutungsereignisse, bei ca. 20-30 % der Kinder entwickelt sich eine chronische Form der ITP [42, 59].

Bei den Erwachsenen sind 20-30 % der neu-diagnostizierten Patienten asymptomatisch und zeigen keine Blutungssymptome, bei den chronischen ca. 30-40 % [59]. Die Blutungssymptome entsprechen ansonsten denen der Kinder. Zu intrazerebralen Blutungen kommt es bei 1,4-1,6 % der Erwachsenen ITP-Patienten [48]. Die chronische Verlaufsform tritt mit ca. 60 % der Erwachsenen häufiger auf als bei Kindern [59].

Bei ITP-Patienten ist das Risiko für die Entwicklung venöser und arterieller Thromboembolien zweifach höher als bei Nicht-ITP-Patienten [26]. Sie sind daher nicht durch ihre Thrombozytopenie vor Schlaganfällen, Herzinfarkten und Thrombosen geschützt [59].

Im Vergleich zu anderen Thrombozytopenien, wie nach Chemotherapie oder bei Myelodysplasien und Leukämien, ist die Blutungsneigung bei ITP-Patienten geringer [59]. Außerdem besteht, bedingt durch ihre immunsuppressive Therapie, Splenektomie und den Thrombozytenmangel an sich, ein erhöhtes Infektionsrisiko [59].

ITP-Patienten haben oft eine reduzierte Lebensqualität mit Erschöpfungssymptomen, Müdigkeit („Fatigue“) und depressiven Störungen, die vor allem zu Krankheitsbeginn besteht und teils schlechter als die von Krebspatienten ist [59]. Auch ein Zusammenhang zwischen der ITP und kognitiven Funktionseinschränkungen wird beschrieben [65].

Der Verlauf der ITP und das Blutungsrisiko kann aktuell bei Diagnosestellung nicht zuverlässig vorhergesagt werden. Prognostische Faktoren und Risikoindikatoren, die eher für einen selbstlimitierenden bzw. chronischen Verlauf sprechen, sowie das Risiko schwerer Blutungen erhöhen, sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Ein bis zwei Drittel der chronischen ITP-Patienten erreichen eine partielle oder komplette Remission. Die

Mortalität durch tödliche Blutungen liegt bei Kindern bei 0 % und bei Erwachsenen bei 0-7 % [59].

Tabelle 2: Prognostische Faktoren und Risikoindikatoren für einen selbstlimitierenden oder chronischen Verlauf und das Auftreten schwerer Blutungen der ITP (aus [35, 59])

Eher selbstlimitierender Verlauf	Eher chronischer Verlauf	Erhöhtes Risiko schwerer Blutungen
<ul style="list-style-type: none"> • Kinder < 10 Jahre • Beginn nach Infekt • plötzlicher Beginn • klinisch ausgeprägte Blutungsneigung • schnelle Therapieansprache 	<ul style="list-style-type: none"> • Erwachsene, v.a. > 60 Jahre • keine vorausgehende Erkrankung • schleichender Beginn • geringe Blutungsneigung • Zufallsbefund • keine/geringe Therapieansprache • höhere Thrombozytenzahl bei Symptombeginn 	<ul style="list-style-type: none"> • > 60 Jahre, • Thrombozytenzahl < 20-30x10⁹/L • Autoantikörper gegen mehrere Thrombozytenantigene gleichzeitig • Infektion, Fieber, Hämaturie • multiple Hämatome, Schleimhautblutungen • fehlende Ansprache auf Kortikosteroide • Kinder: modifizierter Buchanan-Score ≥ 3

1.5 Diagnostik und Differentialdiagnosen

Die ITP ist eine Ausschlussdiagnose. Es gibt aktuell keine zuverlässigen klinischen oder laborchemischen Parameter, welche die Diagnose ITP sicher erlauben. Es wird zwischen der initialen Basisdiagnostik beim Verdacht auf ITP und der weiterführenden Diagnostik bei persistierender/chronischer ITP unterschieden (*siehe* Tabelle 3) [59].

Die initiale Basisdiagnostik beinhaltet die Anamnese, die körperliche Untersuchung, ein Blutbild, sowie die Gerinnungsparameter und die Anfertigung und Begutachtung eines Blutausstrichs durch einen erfahrenen Arzt. Auffällig sind neben einer erhöhten Blutungsneigung in der körperlichen Untersuchung vor allem eine isoliert auftretende Thrombozytopenie mit einer Thrombozytenzahl von < 100x10⁹/L bei ansonsten unauffälligen hämatologischen Parametern [42, 59]. Bedingt durch die Blutungen kann es zusätzlich zu einer Anämie kommen [15].

Ziel der Basisdiagnostik ist außerdem die Abklärung anderer, möglicher Ursachen der Thrombozytopenie. Anfangs auszuschließen ist die relativ häufig auftretende Pseudothrombozytopenie, bei der in mit EDTA antikoagulierten Proben aufgrund von Thrombozytenaggregaten falsch niedrige Thrombozytenzahlen bestimmt werden [42]. Daher sollte das Blutbild aus EDTA und Citratblut bestimmt werden [59]. Auch wichtig ist der Ausschluss der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP), die einen hämatologischen Notfall darstellt und durch Beurteilung des Blutausstrichs gelingt [59]. Das Evans-Syndrom sollte bei einer bestehenden Anämie abgeklärt werden. Hierbei

besteht neben der ITP eine autoimmunhämolytische Anämie vom Wärmetyp und die Patienten besitzen antithrombozytäre, antierythrozytäre und gelegentlich auch antigranulozytäre Antikörper [42]. Eine Indikation zur Knochenmarkpunktion besteht bei atypischen Befunden (Leuko-/Erythrozytenveränderungen, Splenomegalie, Lymphadenopathie) und Patienten ≥ 60 Jahren, sowie vor geplanter Splenektomie und dient dem Ausschluss alternativer Diagnosen wie Lymphomen, idiopathischen Zytopenien unbestimmter Signifikanz (ICUS) und Myelodysplastischen Syndromen (MDS) [59]. Bei der ITP ist die Knochenmarkpunktion meist unauffällig, eventuell findet man eine leicht erhöhte Megakaryozytenzahl als Zeichen der gesteigerten Thrombozytopoese, selten eine erniedrigte Megakaryozytenzahl [15, 30]. Eine Urin- und Stuhluntersuchung auf Blut können erwogen werden [59].

Die weiterführende Diagnostik wird zur weiteren differentialdiagnostischen Abklärung bei persistierender/chronischer ITP durchgeführt (*siehe* Tabelle 3).

Tabelle 3: Bestandteile der Basis- und weiterführenden Diagnostik bei der ITP (modifiziert nach [59])

Basisdiagnostik	Weiterführende Diagnostik
<ul style="list-style-type: none"> • Anamnese • Körperliche Untersuchung • Blutbild, Gerinnungsparameter • Blutausstrich • Evtl. Knochenmarkpunktion 	<ul style="list-style-type: none"> • Thrombozytäre, glykoproteinspezifische Autoantikörper • Serum-Elektrophorese • Autoimmundiagnostik (ANA, ANCA, CCP-AK, anti-ds-DNA, Lupus Antikoagulan, Antiphospholipid-AK) • Schilddrüsendiagnostik • H. pylori-Testung • Von Willebrand-Faktor Multimer-Analyse • Hepatitis B/C, HIV-Serologie • Bildgebung (Sonographie, Röntgen, CT)

Verfügbare Laboruntersuchungen zur Bestätigung der Diagnose der primären ITP sind die Testung auf das Vorliegen von thrombozytären, glykoproteinspezifischen Autoantikörpern und die Messung der unreifen Thrombozytenfraktion (immature platelet fraction (IPF)) [93].

Man unterscheidet zwischen thrombozytenassoziierten Antikörpern (platelet-associated IgG: PAIgG) und glykoproteinspezifischen thrombozytenassoziierten Antikörpern (GP-specific PAIgG). PAIgG beinhalten neben glykoproteingebundenen Antikörpern auch IgG-Moleküle der α -Granula der Thrombozyten und weitere in Abbildung 4 (A) dargestellte membranassoziierte IgG, deren Nachweis unter anderem mit dem Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT) und dem competitive enzyme-linked immunoassay (CELIA) gelingt. Die PAIgG-Menge ist auch bei 50 % der Patienten mit nicht-immunologisch vermittelter Thrombozytopenie erhöht; der Nachweis von PAIgG

weist eine geringe Spezifität von 19-77 % auf und ist daher nicht für die Diagnostik der ITP geeignet [42, 93].

GP-spezifische PAIgG hingegen sind spezifisch gegen einzelne Glykoproteinkomplexe der Thrombozytenoberfläche gerichtet, darunter vor allem GP IIb/IIIa und GP Ib/IX, seltener GP V [93, 113]. Der Nachweis gebundener glykoproteinspezifischer Autoantikörper gelingt mit dem direkten ‚monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens‘ (MAIPA) und dem Immunobead Assay, bei denen diese in einem trimolekularen Komplex (Thrombozyten-Autoantikörper, Zielglykoprotein, monoklonalen Antikörper, *siehe* Abbildung 4 (B)) detektiert werden können (*siehe* 2.2.1) [43, 61, 93]. Mit einer Sensitivität von 63 % und einer Spezifität von 98 % spricht ein positives Resultat im direkten MAIPA stark für das Vorliegen einer ITP, ein negatives Ergebnis ist jedoch von geringer Bedeutung und schließt die Diagnose ITP nicht aus [42, 93].

Im indirekten MAIPA können freie Autoantikörper im Serum nachgewiesen werden, was nur bei einem geringen Anteil von Patienten (ca. 11-25 %) gelingt und auf Grund einer sehr niedrigen Sensitivität dem direkten MAIPA immer unterlegen ist [11, 72, 93]. Die Sensitivität liegt bei 18 % und die Spezifität bei 96 % [93]. Bei einigen Patienten mit sehr niedrigen Thrombozytenzahlen, bei denen der direkte MAIPA nicht durchgeführt werden kann, kann ein positiver, indirekter MAIPA jedoch hilfreich sein [93].

Die Bestimmung der unreifen Thrombozytenfraktion (IPF) mittels Hämatologieanalysatoren, welche bei der ITP erhöht ist, weist eine Sensitivität von 85 % und eine Spezifität von 70 % auf und ist somit als Diagnoseparameter der ITP geeignet [73, 93].

Kuwana et al. kombinierten mehrere Laborparameter und konnten die Sensitivität auf 96 % und die Spezifität auf 94 % für die ITP erhöhen [52]. Drei der folgenden sechs Parameter mussten dabei erfüllt sein, um die ITP zu diagnostizieren:

- Fehlen einer Anämie
- Fehlen einer Leukopenie
- Erhöhte Anzahl Anti-GP IIb/IIIa-Antikörper produzierende B-Zellen
- Nachweis von Anti-GP IIb/IIIa-Antikörpern
- Erhöhter Anteil von retikulären Thrombozyten
- Normale oder leicht erhöhte Plasmakonzentration von TPO (< 300 pg/ml)

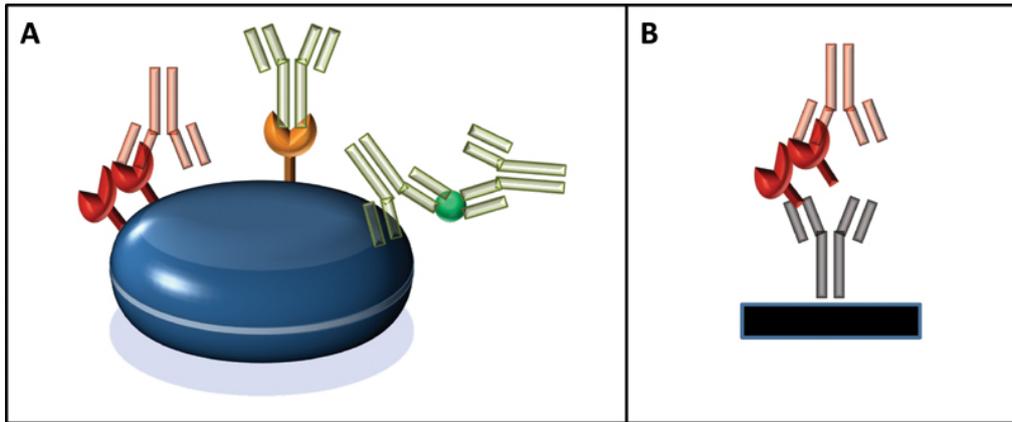


Abbildung 4: Autoantikörper und weitere Immunglobuline von Thrombozyten

(A) Zu den Thrombozytenassoziierten Immunglobulinen (PAIgG) gehören neben den glykoproteinspezifischen Thrombozytenautoantikörpern (rot), die spezifisch für die ITP sind, auch andere unspezifische membrangebundene IgG-Moleküle, z.B. als Immunkomplexe (grün), sowie HLA-I-Antikörper und in α -Granula gespeichertes IgG (nicht gezeigt). (B) Glykoproteinspezifische Tests detektieren glykoproteinspezifische Autoantikörper in einem trimolekularen Komplex, der aus dem Thrombozyten-Autoantikörper (hellrot), dem Zielglykoprotein (rot) und einem monoklonalen Antikörper (grau) besteht, der den Komplex auf einer Mikrotiterplatte verankert. Nach dem Waschen wird das Vorhandensein des Thrombozyten-Autoantikörpers mit einem sekundären, enzymmarkierten Anti-Human-Antikörper (nicht dargestellt) sichtbar gemacht. Mit freundlicher Genehmigung des Thieme Verlags [93].

Weitere Ursache einer sekundären ITP sollten differentialdiagnostisch in Betracht gezogen und abgeklärt werden (*siehe* Tabelle 4). Eine Schilddrüsendiagnostik mit TSH-Bestimmung dient dem Nachweis der Autoimmunthyreoiditis, die bei bis zu 10 % der ITP-Patienten auftritt [59]. Durch die Serum-Elektrophorese können Immundefekt-Syndrome (CVID) ausgeschlossen werden. Patienten mit dem von-Willebrand-Syndrom Typ 2b können ausgeprägte Thrombozytopenien aufweisen, eine Identifikation dieser ist mit der von Willebrand-Faktor Multimer-Analyse möglich [59]. Eine Medikamenten-induzierte Thrombozytopenie kann durch Anamnese und Testung auf medikamentenabhängige Thrombozytenantikörper nachgewiesen werden [59]. Bei Kindern sollte an hereditäre Thrombozytopenien gedacht werden und anhand des Blutausstrichs und MPVs untersucht werden, ob sehr große (Bernard-Soulier-Syndrom, MYH9-assoziierte Syndrome, u.a. oder kleine Thrombozyten (Wiskott-Aldrich-Syndrom) vorhanden sind [59]. Auch die fetale bzw. neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) mit nachweisbaren Alloantikörpern bei der Mutter und normaler mütterlicher Thrombozytenzahl stellt eine wichtige Differentialdiagnose bei Neugeborenen dar, da die FNAIT häufiger ist als eine durch diaplazentar übertragene Autoantikörper der Mutter induzierte Immunthrombozytopenie des Neugeborenen [42]. Die Infektionsdiagnostik (Hepatitis B/C, HIV) stellt, falls positiv, ein Erkrankungs-/Reaktivierungsrisiko dar [59].

Tabelle 4: Differenzialdiagnosen bei V.a. ITP (nach [59])

Differenzialdiagnosen
<ul style="list-style-type: none">• Pseudothrombozytopenie• Hereditäre Thrombozytopenie• Medikamenteninduzierte Thrombozytopenie• Schwangerschaftsassozierte Thrombozytopenie• Posttransfusionelle Purpura• Lymphome• Infektionen• Alkoholabusus• Schwerer Vitaminmangel (B12, Folsäure)• Splenomegalie mit Hypersplenismus• Autoimmunerkrankungen (SLE, Rheumatoide Arthritis u.a.)• Evans-Syndrom• Von Willebrand Syndrom Typ 2b• Verbrauchskoagulopathie• TTP und HUS• Hämatologische Systemerkrankungen (ICUS, Leukämie, MDS u.a.)

Ist die Diagnose ITP gestellt, sollte eine Einschätzung der klinischen Blutungsneigung erfolgen, da sich die Behandlung wesentlich an der Symptomatik orientiert. Bei den Erwachsenen wird die Einteilung anhand der WHO Blutungsgrade (Grad 0-IV) oder den National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI CTCAE v5.0) vorgenommen [59]. Bei pädiatrischen Patienten wird der modifizierte Buchanan Score (Grad 0-5) empfohlen [25].

1.6 Therapie

Die Therapie hängt mit dem Stadium der Erkrankung zusammen (*siehe* Tabelle 1). In allen Stadien sind Prophylaxe und Therapie klinisch relevanter Blutungen sowie Kuration stets das Ziel. Bei der neu-diagnostizierten ITP nimmt man bei kurzer Therapiedauer Nebenwirkungen in Kauf, bei der persistierenden sind Nutzen und Nebenwirkungen stärker gegeneinander abzuwägen und bei der chronischen ITP, bei der eine dauerhafte Remission immer unwahrscheinlicher wird, steht vor allem die Lebensqualität des Patienten im Vordergrund und eine chronische Thrombozytopenie ohne Komplikationen kann gegebenenfalls akzeptiert werden [59].

Das Blutungs- und Mortalitätsrisiko steigt, wenn die Thrombozytenzahl unter $30 \times 10^9/L$ fällt. Es gibt aber große individuelle Schwankungen und die Festlegung eines Thrombozytenschwellenwertes, ab dem Blutungen auftreten, ist für die Prognose des individuellen Verlaufs nicht geeignet [59]. Entgegen früherer Leitlinienempfehlungen wird daher aktuell die Therapieindikation nicht mehr nur anhand der Thrombozytenzahl gestellt, sondern zusätzlich die klinische Blutungsneigung (WHO Blutungsgrade), das

Alter, der Wunsch des Patienten und weitere Risikofaktoren in die Bewertung miteinbezogen [2, 59, 66].

Bei neu-diagnostizierter ITP, fehlender bis milder Blutungsneigung (WHO 0-II) und Thrombozytenwerten $> 20\text{-}30 \times 10^9/\text{L}$ kann eine „Watch & Wait“-Strategie verfolgt werden. Liegt der Thrombozytenwert unter $20\text{-}30 \times 10^9/\text{L}$ besteht die Erstlinientherapie aus der Gabe von Kortikosteroiden (*siehe* Tabelle 5). Bei schweren Blutungen (WHO III/IV) ist die Therapieindikation immer gegeben und besteht aus Kortikosteroiden und i.v. Immunglobulinen (IVIg). Bei Kindern und Jugendlichen wird eine Therapie (GK und/oder IVIg) ab dem Blutungsgrad 3b nach dem modifizierten Buchananscore empfohlen [25].

Kortikosteroide wirken unter anderem auf die antikörperproduzierenden B-Zellen immunsuppressiv, wodurch die Thrombozytenzahl ansteigt [59]. Auf Grund des großen Nebenwirkungsspektrums und der meist fehlenden langfristigen Remission sollte ihre Anwendung möglichst kurz gehalten werden, laut aktuellen Empfehlungen zwischen 3-6 Wochen [59, 76]. Praktische Anwendung finden vor allem die Präparate Prednison und Dexamethason, wobei bei Letzterem ein schnelleres Ansprechen und weniger Nebenwirkungen gefunden wurden [59, 66]. Eine Osteoporoseprophylaxe ist bei Risikopatienten (≥ 70 Jahre, postmenopausale Frauen, hohe Steroiddosis) indiziert und besteht aus allgemeinen Maßnahmen (Alkohol- und Nikotinkarenz, Vitamin-D und Calcium-Supplementierung) und medikamentöser Prophylaxe mit Bisphosphonaten [59].

Einen schnelleren Anstieg der Thrombozytenzahl als Kortikosteroide erreichen intravenös applizierte Immunglobuline, indem sie die Phagozytose von antikörperbeladenen Thrombozyten verhindern. Daher werden sie bei schweren und lebensbedrohlichen Blutungen (WHO III/IV) und vor dringenden Operationen eingesetzt [9, 59]. Auch die Behandlung mit IVIg erzielt keine Langzeitremission [59]. Im Notfall können zusätzlich Thrombozytenkonzentrate, Rituximab, Thrombopoetin-Rezeptor-Agonisten (TRAs) und/oder Anti-D-Immunglobuline eingesetzt werden [59]. Bei Nichtansprechen ist die Notfallsplenektomie Mittel der Wahl, da dadurch der Hauptort der Thrombozyteneliminierung entfernt wird [59].

Spricht die Erstlinientherapie nicht an, wird diese schlecht vertragen oder kommt es zu einem Rezidiv, wird die Zweitlinientherapie angewandt (*siehe* Tabelle 5). Optionen sind hierbei TRAs, Fostamatinib oder die Splenektomie. Bei fehlender bis mittelschwerer Blutung (WHO 0-II) ist auch die engmaschige Überwachung im Sinne einer „Watch & Wait“-Strategie möglich, wobei der Patientenwunsch berücksichtigt werden sollte. Auf Grund des relativen Thrombopoetinmangels bei ITP-Patienten erreichen die

TRAs eine Erhöhung der Thrombozytenzahl durch Stimulierung der Thrombozytopoese. Der angestrebte Zielbereich der Thrombozytenzahl ist $50-150 \times 10^9/L$. Die zugelassenen, angewandten Präparate sind Eltrombopag, Romiplostim und Avatrombopag, die sich in ihrer Applikationsweise und ihren Nebenwirkungen unterscheiden, jedoch nicht bezüglich ihrer Sicherheit und Wirksamkeit. Bei über 90 % der Patienten wird ein kurzfristiges und bei 30-90 % der Patienten ein langfristiges Ansprechen erreicht und ca. die Hälfte der Patienten können alle anderen ITP-Medikamente absetzen. Die TRAs sind bei Kindern, Erwachsenen und splenektomierten Patienten wirksam [59]. Ein Absetzversuch kann bei einer Remissionsrate von 13-30 % versucht werden, welcher langsam über mehrere Monate erfolgen sollte [38]. Fostamatinib ist ein SYK-Inhibitor (Spleen Tyrosine Kinase), der für die chronische ITP zugelassen ist [59]. SYK ist ein Signaltransduktionsmodulator, dessen Inhibition zu einer Hemmung der Signaltransduktion der B-Zell-Rezeptoren sowie der Fc-aktivierenden Rezeptoren führt und die durch Antikörper vermittelte Zerstörung der Thrombozyten reduziert [59, 60]. Die Splenektomie ist bei Patienten mit schweren Blutungen (WHO III/IV) und Nichtansprechen auf vorherige Therapieversuche indiziert. Eine individuelle Entscheidung ist bei Patienten mit Blutungen der Grade 0-II nötig, da auch die Risiken und Nebenwirkungen der Splenektomie beachtet werden müssen, unter anderem der postoperativen Mortalität (1 %), Morbidität (ca. 10 %) und dem dreifach erhöhten Risiko der Entwicklung einer Overwhelming Post Splenectomy Infection (OPSI). Etwa 60 % der splenektomierten Patienten erreichen eine partielle oder komplette Remission; da aber 40 % der Patienten ein Rezidiv erleiden, lehnen viele die Splenektomie ab, weshalb sie immer seltener durchgeführt wird. Eine Splenektomie-aufschiebende medikamentöse Therapie kann mit Rituximab (off-label) erfolgen, das eigentlich Bestandteil der Drittlinientherapie ist. Rituximab ist ein monoklonaler Antikörper, der an CD20 der B-Lymphozyten bindet und deren selektive Depletion induziert, wodurch die Bildung von thrombozytären Autoantikörpern supprimiert wird. Eine langfristige Remission erreichen 10-40 % der Patienten [59].

Neben Rituximab sind noch folgende Medikamente Optionen der Drittlinientherapie: Azathioprin, Ciclosporin, Cyclophosphamid, die für die ITP-Behandlung zugelassen sind und Danazol, Dapson, Hydroxychloroquin, Mycophenolat-Mofetil als off-label use (siehe Tabelle 5) [59].

Ist auch bei der Drittlinientherapie keine Besserung zu verzeichnen, wird eine Kombination mehrerer ITP-Wirkstoffe eingesetzt, bspw. Rituximab mit TRAs und Steroiden [59].

Tabelle 5: Leitlinientherapie der ITP 2020 ([59])

Therapie	therapiepflichtig	schwere/lebensbedrohliche Blutungen
Erstlinientherapie	<ul style="list-style-type: none"> • Kortikosteroide 	<ul style="list-style-type: none"> • Kortikosteroide + IVIG
Zweitlinientherapie	<ul style="list-style-type: none"> • TRA • Fostamatinib • Splenektomie 	<i>weitere Optionen:</i> <ul style="list-style-type: none"> • Thrombozytenkonzentrate • TRA • Rituximab • Notfallsplenektomie
Drittlinientherapie	<ul style="list-style-type: none"> • Azathioprin • Ciclosporin • Cyclophosphamid • Danazol • Dapson • Hydroxychloroquin • Mycophenolat-Mofetil • Rituximab • Kombination • Splenektomie 	

Bei ITP-Patienten sollte darauf geachtet werden, vor Operationen eine adäquate Thrombozytenzahl zu gewährleisten, um Blutungen zu vermeiden. Eine Antikoagulation ist bei Thrombozytopenie formal kontraindiziert; besteht allerdings eine dringliche Indikation zur Antikoagulation sollte diese abhängig von der Thrombozytenzahl erfolgen. Bei einer Thrombozytenzahl $> 50 \times 10^9/L$ wird eine reguläre, bei $20-50 \times 10^9/L$ eine halbe und bei Thrombozyten $< 20 \times 10^9/L$ in der Regel keine Antikoagulation verabreicht. Der TH2-Score (Thrombosis and Thrombocytopenia Risk Assessment Score) kann helfen das Blutungs- und Thromboserisiko abzuwägen und die Entscheidung zur Indikation einer Antikoagulation zu erleichtern [59].

1.7 Thrombozytäre Glykoproteine

Wie bei der Pathogenese beschrieben, stellen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V die Hauptzielantigene der bei ITP-Patienten produzierten thrombozytären Autoantikörper dar [113]. Diese sind Bestandteil membranständiger, transmembranärer Glykoproteinrezeptoren: dem Fibrinogenrezeptor (GP IIb/IIIa-Komplex) und dem von-Willebrand-Faktor-Rezeptor (GP Ib/IX/V-Komplex). Diese spielen eine wichtige Rolle bei der primären Hämostase und der Vermittlung zwischen Intra- und Extrazellulärraum [67, 118]. Bei der ITP kommt es durch die Autoantikörperbindung zu deren Funktionsbeeinträchtigung [59].

Aufbau und Funktion der Glykoproteinrezeptoren GP IIb/IIIa und GP Ib/IX/V werden im Folgenden näher erläutert.

1.7.1 Aufbau

1.7.1.1 von-Willebrand-Faktor-Rezeptor (GP Ib/IX/V-Komplex)

Der Glykoproteinkomplex GP Ib/IX/V (von-Willebrand-Faktor-Rezeptor) gehört zur Familie der leucinreichen Glykoproteine (LRR = leucine-rich repeat family) [18]. Mit ca. 25.000 Kopien pro Thrombozyt stellt er, nach dem Integrin GP IIb/IIIa, den zweithäufigsten Thrombozytenrezeptor dar [14, 18]. Der GP Ib/IX/V-Komplex besteht aus den vier transmembranären Glykoproteinen GP Ib α , GP Ib β , GP IX und GP V [14]. Diese Proteine werden von vier verschiedenen Genen codiert, die sich auf den Chromosomen 17q12 (GP Ib α), 22q11.2 (GP Ib β), 3q29 (GP V) bzw. 3q21 (GP IX) befinden [14]. Jede der vier Untereinheiten besitzt leucinreiche Motive, die aus 20-29 Aminosäuren bestehen, von konservierten N- und C-terminalen Disulfidschleifen flankiert werden und bei verschiedenen Proteininteraktionen beteiligt sind [47, 56]. Daneben enthält jede Untereinheit eine große N-terminale extrazelluläre Domäne, ein muzinähnliches Makroglykopeptid, eine Transmembranhelix und einen kurzen zytoplasmatischen Schwanz [3, 14]. Im GP Ib α befindet sich die Bindungsstelle für den Hauptliganden von-Willebrand-Faktor (vWF) [14]. Weitere Liganden vom GP Ib α sind Thrombin, P-Selektin, Thrombospondin, Mac-1, Faktor XI, Faktor XII und HMK-Kininogen [14]. GP Ib α und GP Ib β sind über die Cysteinreste Cys484 und Cys485 in GP Ib α und Cys122 in GP Ib β über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden, während GP IX durch starke und GP V durch schwache nicht kovalente Bindungen an den GP Ib-Rezeptor gebunden sind [14, 17]. Durch die Interaktion zwischen ihren transmembranären und extrazellulären Domänen bilden die Untereinheiten GP Ib α , GP Ib β und GP IX den eng integrierten GP Ib-IX-Komplex [67]. Für die Verankerung des GP V im GP Ib-IX-Komplex sind die beiden transmembranären Domänen von GP V und GP Ib α verantwortlich, unverzichtbar sind hier insbesondere die polaren Reste beim GP V [67]. Der GP Ib/IX/V-Komplex besteht aus zwei GP Ib α -Ib β -IX Trimeren, die durch ein GP V verbunden sind (siehe Abbildung 5) [14].

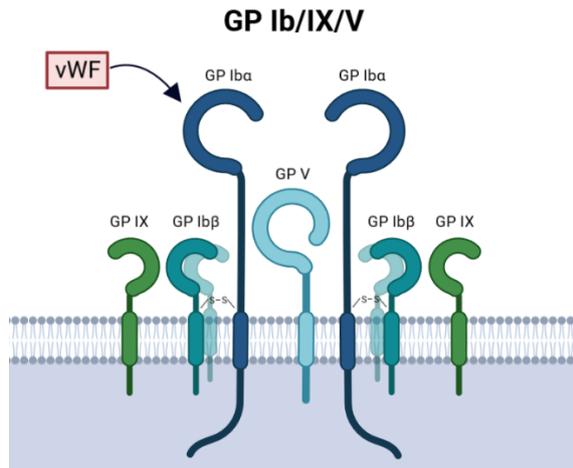


Abbildung 5: schematischer Aufbau des GP Ib/IX/V-Komplexes (von-Willebrand-Faktor-Rezeptor)

Der GP Ib/IX/V-Komplex besteht aus zwei GP Ib α -Ib β -IX Trimeren, welche durch ein GP V verbunden sind. Die Glykoproteine GP Ib α und GP Ib β sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Die Glykoproteine GP IX und GP V sind jeweils über nicht-kovalente Bindungen mit dem GP Ib-Komplex verbunden. Die Bindungsstelle des von-Willebrand-Faktors (vWF) befindet sich im GP Ib α . Eine weitere Bindungsstelle für Thrombin befindet sich im GP V (nicht dargestellt) [14, 17, 92]. *Created with Biorender.com*

Der extrazelluläre N-terminale Anteil vom GP Ib α (135 kDa, 610 Aminosäuren) enthält innerhalb der Aminosäuren 1-282 die Ligandenbindungsstelle des GP Ib/IX/V-Komplexes [4, 14]. Diese Domäne besteht aus einer N-terminalen Sequenz mit einer Disulfidbrücke (Cys4-Cys17), acht LRR-Domänen, einer C-terminalen Sequenz mit einer Disulfidschleife („R-Loop“, Cys209-Cys248 und Cys211-264) und einer anionischen Sequenz, die drei sulfatierte Tyrosine enthält [4, 14]. Bei der Bindung von vWF sind alle Regionen der extrazellulären N-terminalen Sequenz beteiligt, während die Bindung von Thrombin ausschließlich im Bereich der anionischen Sequenz lokalisiert ist; dessen Sulfatierung ist essenziell für die Bindung von vWF und Thrombin [111]. Die leichte β -Kette des GP Ib (26 kDa, 181 Aminosäuren) enthält nur eine LRR-Domäne und ist essenziell für den Einbau von GP Ib α und GP IX in die Thrombozytenmembran und deren Interaktion [14, 56]. Auch das GP IX (22 kDa, 160 Aminosäuren) besitzt nur eine LRR-Domäne [14]. GP V (82 kDa, 544 Aminosäuren) enthält 15 LRR-Domänen in seinem extrazellulären Anteil und eine Thrombinbindungsstelle, wodurch ein 69 kDa-schweres lösliches Fragment (V_{fl}) abgespalten wird [14, 92]. Die Thrombinwirkung der Thrombozytenaktivierung- und aggregation wird dadurch nicht induziert [92].

Der vWF ist ein multimeres, adhäsives Glykoprotein, das in α -Granula der Thrombozyten und in Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert wird und auf der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen exprimiert wird [5, 6]. In seiner reifen Form besteht ein vWF-Multimer aus über Disulfidbrücken verbundenen ca. 275 kDa großen Untereinheiten, die je aus 12 konservierten Domänen aufgebaut

sind [5]. Die A1-Domäne enthält die Bindungsstelle für GP Iba; die A3-Domäne bindet Kollagen und die C4-Domäne das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (GP IIb/IIIa-Komplex) [5, 14].

1.7.1.2 Fibrinogenrezeptor (GP IIb/IIIa-Komplex)

Der GP IIb/IIIa-Komplex, nach seinem Hauptliganden auch Fibrinogenrezeptor genannt, gehört zur Familie der Integrine [24, 71, 80]. Integrine sind Membranrezeptoren, die auf den meisten Zelltypen vorhanden sind und Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen vermitteln [10, 18]. Das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (GP IIb/IIIa) ist mit einer Anzahl von ca. 80.000 Kopien pro Thrombozyt das Hauptoberflächenglykoprotein, dessen Expression auf Thrombozyten und Megakaryozyten beschränkt ist [10, 18].

Entsprechend der charakteristischen heterodimeren, calciumabhängigen Struktur der Integrine setzt sich das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ aus der αIIb -Untereinheit (GP IIb) und der nichtkovalent gebundenen β_3 -Untereinheit (GP IIIa) zusammen [18, 24]. Jede Untereinheit ist das Produkt eines separaten Gens auf Chromosom 17 und enthält eine große N-terminale extrazelluläre Domäne, eine transmembranäre Domäne und einen kurzen zytoplasmatischen Schwanz [10].

Die αIIb -Untereinheit (136 kDa, 1008 Aminosäuren) besteht aus einer schweren (125 kDa) und einer leichten (23 kDa) Kette, die durch posttranslationale Proteolyse entstehen und über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben [10, 83]. Die leichte Kette enthält die transmembranären und zytoplasmatischen Domänen, während die gesamte schwere Kette extrazellulär liegt [10]. Die β_3 -Untereinheit (110 kDa, 763 Aminosäuren) besteht aus einer einzigen Polypeptidkette [10, 83]. Die Ligandenbindungsstelle befindet sich in der N-terminalen Domäne beider Untereinheiten [10]. Für die Thrombozytenaggregation wichtige Liganden sind vor allem Fibrinogen und der vWF [10]. Weitere Liganden sind Fibronektin, Vitronektin und Thrombospondin-1 [10]. Die Liganden enthalten RGD-Sequenzen (Arg-Gly-Asp), die vom $\alpha\text{IIb}\beta_3$ erkannt und gebunden werden. Lösliches Fibrinogen kann alternativ auch über die Aminosäuresignalsequenz KQAGDV (Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val) am C-terminalen Ende der γ -Kette an den Rezeptor binden [10, 82].

Die Kristallstruktur von $\alpha\text{IIb}\beta_3$ zeigt eine ‚Knie‘-ähnliche Region im extrazellulären Anteil beider Untereinheiten, die es dem Rezeptor ermöglicht, zwischen einer gebeugten, inaktiven und aufgerichteten, aktiven Form zu wechseln [10].

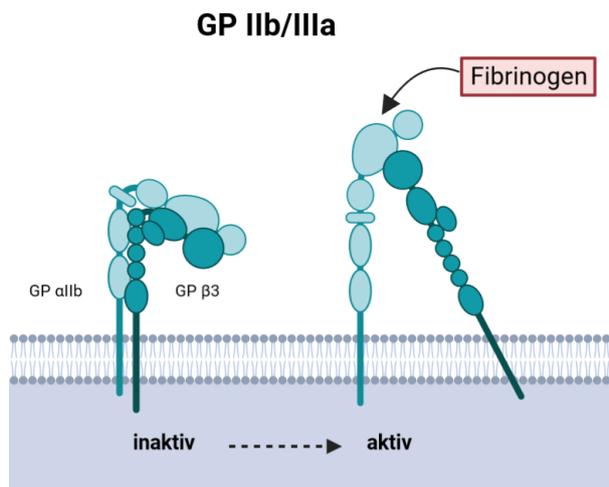


Abbildung 6: schematischer Aufbau des GP IIb/IIIa-Komplexes (Fibrinogen-Rezeptor)

Der GP IIb/IIIa-Komplex besteht aus der αIIb-Untereinheit (GP IIb) und der nichtkovalent gebundenen β3-Untereinheit (GP IIIa). Die Kristallstruktur des Komplexes zeigt eine ‚Knie‘-ähnliche Region im extrazellulären Anteil beider Untereinheiten, die es dem Rezeptor ermöglicht, zwischen einer gebeugten, inaktiven und aufgerichteten, aktiven Form zu wechseln. Die Ligandenbindungsstelle befindet sich in der N-terminalen Domäne beider Untereinheiten (hier gezeigt: Fibrinogen) [10, 24]. *Created with Biorender.com*

Integrine können ihre Signale bidirektional weiterleiten [32]. Bei der Aktivierung des αIIbβ3-Integrins durch den GP Ib/IX/V-Komplex (siehe 1.7.2) werden intrazelluläre Signalkaskaden angestoßen, die zur Aktivierung und Freilegung der hochaffinen Bindungsstelle des Rezeptors führen (Inside-Out-Signaling) [10, 32]. Die extrazelluläre Ligandenbindung führt wiederum zur Verstärkung des Inside-Out-Signals und somit zur weiteren Thrombozytenaktivierung (Outside-In-Signaling) [10]. Dabei werden weitere in den α-Granula gespeicherte Rezeptormoleküle aus dem Zellinneren rekrutiert und die Thrombozytenmembran eingebaut [10, 21].

1.7.2 Funktion der Glykoproteinkomplexe GP Ib/IX/V und GP IIb/IIIa

Nach Gefäßverletzungen dient der komplexe Prozess der Hämostase der Blutstillung und Blutgerinnung. Bei der primären, zellulären Hämostase wird ein weißer Thrombus gebildet, der den Endotheldefekt abdeckt. Die Thrombozyten spielen dabei eine entscheidende Rolle und durchlaufen drei Schritte: Adhäsion, Aktivierung und Aggregation. Die sekundäre, plasmatische Hämostase bewirkt durch die Gerinnungskaskade die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Dadurch entsteht ein stabiles Thrombus-Fibrinnetz, in dem sich u.a. Erythrozyten verfangen und ein roter Thrombus gebildet wird, der die Wunde mechanisch stabil verschließt [112].

Die Glykoproteinkomplexe GP Ib/IX/V und GP IIb/IIIa spielen bei der primären Hämostase eine entscheidende Rolle [67]. Die Funktionen der Glykoproteinkomplexe werden vor allem durch die Bindung ihrer Liganden von-Willebrand-Faktor, Thrombin und Fibrinogen initiiert [6, 10, 67].

Eine wichtige physiologische Rolle des GP Ib/IX/V besteht darin, bei hoher Scherkraft die initiale Adhäsion von zirkulierenden Thrombozyten mittels im Plasma enthaltenem von-Willebrand Faktor an die subendotheliale Matrix zu vermitteln und so zur Thrombusbildung beizutragen [3, 111]. Dabei entsteht eine adhäsive Wechselwirkung mit hoher Affinität durch die Aktivierung und Konformationsänderung sowohl des GP Ib α als auch des vWF [111]. Nach Uff et al. wird die Bindungsstelle für GP Ib α in der A1-Domäne durch Entfaltung des im Plasma enthaltenden vWF freigelegt und der vWF durch Bindung an das Subendothel aktiviert [14, 111]. Zunächst bildet die anionische Region von GP Ib α eine schwache Wechselwirkung mit der A1-Domäne des vWF, wodurch GP Ib α aktiviert wird, eine zweite A1-Bindungsstelle des vWF freigelegt wird und eine hochaffine Bindung entsteht [111]. Ähnlich dem durch Selektine vermittelten Leukozytenrolling, kann der GP Ib/IX/V-Komplex die Translokation der Thrombozyten entlang einer mit vWF beschichteten Oberfläche vermitteln, indem die Bindung schnell aufgelöst und neu gebildet wird, wodurch die Thrombozyten verlangsamt werden [5, 56]. Für eine stabile Adhäsion werden zusätzlich die Kollagenrezeptoren GP VI und GP Ia/IIa (α 2 β 1-Integrin), sowie der Fibronektinrezeptor (α 5 β 1-Integrin) benötigt [14, 68]. Diese sind bei geringer Scherkraft im Wesentlichen unabhängig vom GP Ib/IX/V-Komplex bei der Adhäsion involviert, da hierbei keine Bindung zwischen vWF und GP Ib α stattfindet [3, 14].

Die Bindung von vWF an den GP Ib/IX/V-Komplex induziert die Thrombozytenaktivierung und wandelt das Hauptintegrin α IIb β 3 (Fibrinogenrezeptor) in einen Rezeptor mit hoher Affinität um, der in der Lage ist, die C4-Domäne von vWF zu binden [14]. Dieser Schritt ist essenziell für eine stabile Adhäsion und für die anschließende Reorganisation des Zytoskeletts, die zu einer kugeligen Thrombozytenform mit Pseudopodienbildung führt [14, 104]. Die Thrombinbindung an die GP Ib α -Untereinheit ermöglicht eine Thrombozytenaktivierung auch bei niedrigen Konzentrationen von Thrombin [56]. Die Thrombinbindung an die GP V-Untereinheit ist nach Ramakrishnan et al. ein negativer Regulator der Thrombozytenaktivierung und führt zu deren Reduktion [90]. Der genaue Mechanismus der Thrombozytenaktivierung ist umstritten; intrazellulär ausgelöste Signalkaskaden führen zu einem Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration und der Aktivierung verschiedener Moleküle [14, 56]. Diese Thrombozytenaktivierung wird durch die Sekretion von ADP und die Stimulation der Thromboxan A2 (TXA2)-Synthese verstärkt und führt zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten [14, 56, 112]. Die gleichzeitige Bindung von dimerem Fibrinogen an GP IIb/IIIa-Rezeptoren benachbarter Thrombozyten führt zur deren Quervernetzung; die zusätzliche Bindung von vWF an den GP IIb/IIIa-Rezeptor führt zur irreversiblen Thrombozytenaggregation und Ausbildung eines weißen Thrombus [10, 94]. Die

Bindung anderer Liganden an den GP IIb/IIIa-Rezeptor, insbesondere Vitronectin, Fibronectin und Thrombospondin-1, kann die Thrombozytenadhäsion an Komponenten der subendothelialen Matrix vermitteln und die Thrombozytenaggregation regulieren [10].

Bei der ITP führen die in der Pathogenese beschriebenen Mechanismen zu einer dysfunktionalen, primären Hämostase und einer daraus resultierenden Blutungsneigung [58, 59].

1.8 Fragestellung

Die klinische Bedeutung des Nachweises von thrombozytären Autoantikörpern für die Diagnose der ITP ist umstritten [41]. Es gibt keinen Standardtest oder Biomarker für die Diagnose der Immunthrombozytopenie [116]. Anders als die deutsche Leitlinie empfehlen internationale Leitlinien die Suche nach Autoantikörpern durch eine erweiterte Labordiagnostik nicht [20, 59, 76, 93]. Im „New England Journal of Medicine“ wird die Antikörperdiagnostik nicht empfohlen; in der Leitlinie der „American Society of Hematology“ wird sie nicht erwähnt [20, 76]. Obwohl der Nachweis charakteristischer, thrombozytär gebundener Autoantikörper eine ITP sichern kann, wird die Diagnose oft auf der Basis des Ausschlusses anderer Ursachen einer Thrombozytopenie gestellt [93]. Direkte glykoproteinspezifische Tests, wie der direkte MAIPA, besitzen die erforderliche Spezifität zum Nachweis charakteristischer ITP-Autoantikörper [93]. Es stellt sich die Frage, ob es sich bei den thrombozytären Autoantikörpern um ein Epiphänomen handelt oder, ob sie von kausaler Bedeutung sind.

Um die klinische Bedeutung und das diagnostische Potenzial des direkten MAIPA, und ferner des indirekten MAIPA, bei Verdacht auf ITP zu untersuchen, befasst sich die folgende Arbeit mit der Assoziation zwischen dem Nachweis thrombozytärer Autoantikörper und dem Schweregrad der Immunthrombozytopenie. Der Nachweis zellgebundener und freier thrombozytärer Autoantikörper gegen definierte Glykoproteine (direkter MAIPA: GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V; indirekter MAIPA: GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa) und die Thrombozytenzahl werden analysiert. Der Antikörperspiegel und die Anzahl der anvisierten Glykoproteine sollten mit einer Thrombozytopenie assoziiert sein, wenn der Test diagnostisch genutzt wird. Die Etablierung einer zuverlässigen Labordiagnostik könnte helfen, Fehldiagnosen und den Einsatz unwirksamer, kostspieliger Pharmaka zu reduzieren [93].

Im Rahmen einer retrospektiven Analyse an 18.579 ITP-Verdachtsfällen ohne a priori Annahme über die Diagnose soll in der vorliegenden Arbeit die mögliche Assoziation von thrombozytären Autoantikörpern mit der Thrombozytenzahl untersucht werden.

Anhand des PICO-Modells (**P**opulation/ **I**ntervention (Risk Factor)/ **C**omparison/

Outcome; Population/ Intervention (Risikofaktor)/ Vergleichsgruppe/ Zielgröße) wurden folgende Fragestellungen entwickelt:

- PICO Frage 1: Sind thrombozytär gebundene Anti-GP IIb/IIIa, Anti-GP Ib/IX oder Anti-GP V ein möglicher Risikofaktor bei ITP-Verdachtsfällen?
Besteht bei Kindern/Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP (Population) mit Nachweis thrombozytär gebundener Autoantikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V im direkten MAIPA (Intervention/Risikofaktor) im Vergleich zu Patienten ohne Nachweis thrombozytär gebundener Autoantikörper (Vergleichsgruppe) eine Thrombozytopenie (Zielgröße)?
- PICO Frage 2: Sind freie thrombozytäre Anti-GP IIb/IIIa, Anti-GP Ib/IX oder Anti-GP Ia/IIa ein möglicher Risikofaktor bei ITP-Verdachtsfällen?
Besteht bei Kindern/Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP (Population) mit Nachweis freier, thrombozytärer Autoantikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/IIa im indirekten MAIPA (Intervention/Risikofaktor) im Vergleich zu Patienten ohne Nachweis freier, thrombozytärer Autoantikörper (Vergleichsgruppe) eine Thrombozytopenie (Zielgröße)?
- PICO Frage 3: Ist die Menge von glykoproteinspezifischen, gebundenen thrombozytären Autoantikörpern ein möglicher Risikofaktor für eine niedrigere Thrombozytenzahl bei Patienten mit Thrombozytopenie?
Besteht bei Kindern/Erwachsenen mit einer Thrombozytopenie (Population) mit Nachweis einer hohen Menge thrombozytär gebundener Autoantikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V im direkten MAIPA (Intervention/Risikofaktor) im Vergleich zu Patienten mit Nachweis einer geringen Menge thrombozytär gebundener Autoantikörper (Vergleichsgruppe) eine niedrigere Thrombozytenzahl (Zielgröße)?
- PICO Frage 4: Ist die Menge von glykoproteinspezifischen, freien thrombozytären Autoantikörpern ein möglicher Risikofaktor für eine niedrigere Thrombozytenzahl bei Patienten mit Thrombozytopenie?
Besteht bei Kindern/Erwachsenen mit einer Thrombozytopenie (Population) mit Nachweis einer hohen Menge freier, thrombozytärer Autoantikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/IIa im indirekten MAIPA (Intervention/Risikofaktor) im Vergleich zu Patienten mit Nachweis einer geringen Menge freier, thrombozytärer Autoantikörper (Vergleichsgruppe) eine niedrigere Thrombozytenzahl (Zielgröße)?

- PICO Frage 5: Ist die Zahl der Ziel-Glykoproteine von gebundenen thrombozytären Autoantikörpern ein möglicher Risikofaktor für eine niedrigere Thrombozytenzahl bei Patienten mit Thrombozytopenie?

Besteht bei Kindern/Erwachsenen mit einer Thrombozytopenie (Population) mit Nachweis thrombozytär gebundener Autoantikörper gegen mehrere Glykoproteinkomplexe (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und/oder GP V) im direkten MAIPA (Intervention/Risikofaktor) im Vergleich zu Patienten mit Nachweis thrombozytär gebundener Autoantikörper gegen einen der Glykoproteinkomplexe (Vergleichsgruppe) eine niedrigere Thrombozytenzahl (Zielgröße)?
- PICO Frage 6: Ist die Zahl der Ziel-Glykoproteine von freien thrombozytären Autoantikörpern ein möglicher Risikofaktor für eine niedrigere Thrombozytenzahl bei Patienten mit Thrombozytopenie?

Besteht bei Kindern/Erwachsenen mit einer Thrombozytopenie (Population) mit Nachweis freier, thrombozytärer Autoantikörper gegen mehrere Glykoproteinkomplexe (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und/oder GP Ia/IIa) im indirekten MAIPA (Intervention/Risikofaktor) im Vergleich zu Patienten mit Nachweis freier, thrombozytärer Autoantikörper gegen einen der Glykoproteinkomplexe (Vergleichsgruppe) eine niedrigere Thrombozytenzahl (Zielgröße)?
- PICO Frage 7: Ist das gleichzeitige Vorhandensein von freien und gebundenen Thrombozyten-Autoantikörpern ein möglicher Risikofaktor für eine niedrigere Thrombozytenzahl bei Patienten mit Thrombozytopenie?

Besteht bei Kindern/Erwachsenen mit einer Thrombozytopenie (Population) mit Nachweis freier und gebundener Thrombozyten-Autoantikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX im direkten und indirekten MAIPA (Intervention/Risikofaktor) im Vergleich zu Patienten mit Nachweis freier oder gebundener Thrombozyten-Autoantikörper gegen die Glykoproteinkomplexe (Vergleichsgruppe) eine niedrigere Thrombozytenzahl (Zielgröße)?

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv und Datenerhebung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Labordaten von 22.830 Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP in einer retrospektiven Studie hinsichtlich der Fragestellung „Assoziation zwischen dem Nachweis von thrombozytären Autoantikörpern und Schweregrad der ITP“ untersucht. Extrahiert wurden die Daten in Form einer Excel-Datei aus dem Laborinformationssystem des Thrombozytenlabors des Instituts für Klinische Immunologie, Transfusionsmedizin und Hämostaseologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Anfangs erfolgte eine umfangreiche Umkodierung der Daten von geschriebenen Informationen zu numerischen Werten, darunter: 0 = negativ, grenzwertig positiv (+) = 1, schwach positiv (1+) = 2, mäßig positiv (2+) = 3, deutlich positiv (3+) = 4, stark positiv (4+) = 5.

Die Grundgesamtheit des Patientenkollektivs umfasste zunächst alle Patienten, die im Zeitraum vom 01.01.2000 bis zum 30.06.2019 mit dem Verdacht auf eine Immunthrombozytopenie in das Thrombozytenlabor des Instituts für Klinische Immunologie, Transfusionsmedizin und Hämostaseologie der Justus-Liebig-Universität Gießen eingeschickt wurden. Die Laborproben wurden mit dem Untersuchungsprofil „Immunthrombozytopenie“ analysiert. Neben der Angabe von Alter und Geschlecht beinhaltete dieses Profil folgende Komponenten: Thrombozytenzahl (Counter); direkter MAIPA für die Glykoproteine IIb/IIIa, Ib/IX und V; PIFT und PIFT-Stärke. Der indirekte MAIPA für die Glykoproteine IIb/IIIa, Ib/IX und Ia/IIa wurde bei einem Teil der Patienten zusätzlich durchgeführt.

Die Grundgesamtheit umfasste anfangs 22.830 Patientendaten (*siehe* Abbildung 7). Patienten mit fehlender Altersangabe (n = 82) oder Folgeuntersuchungen (n = 3.855) wurden ausgeschlossen. Durch eine Datenbankabfrage des Thrombozytenlabors konnten Patienten mit bekannten Allo-Antikörpern (n = 119), einer neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (NAIT) (n = 88), einer posttransfusionellen Purpura (PTP) (n = 5), einer medikamentinduzierten Thrombozytopenie (MTP) (n = 70) oder bekannter Einnahme von ReoPro® (n = 5) identifiziert und ausgeschlossen werden. Ringversuchsproben (n = 27) wurden nicht beachtet.

Danach umfasste die Kohorte 18.579 Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP, welche in Kinder (0-18 Jahre) und Erwachsene (19-100 Jahre) aufgeteilt wurden. Bei allen Fragestellungen und Analysen wurden Kinder und Erwachsene getrennt voneinander betrachtet. Nach Maßgabe der immunhämatologischen Befunde wurden folgende Patientengruppen gebildet: Patienten mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA (DM positiv/negativ), Patienten mit positivem oder

negativem Testergebnis im indirekten MAIPA (IM positiv/negativ) und Patienten mit positivem oder negativem Testergebnis im Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT positiv/negativ). Die entsprechende Aufteilung mit Angabe der Stichprobengrößen ist in Abbildung 7 dargestellt.

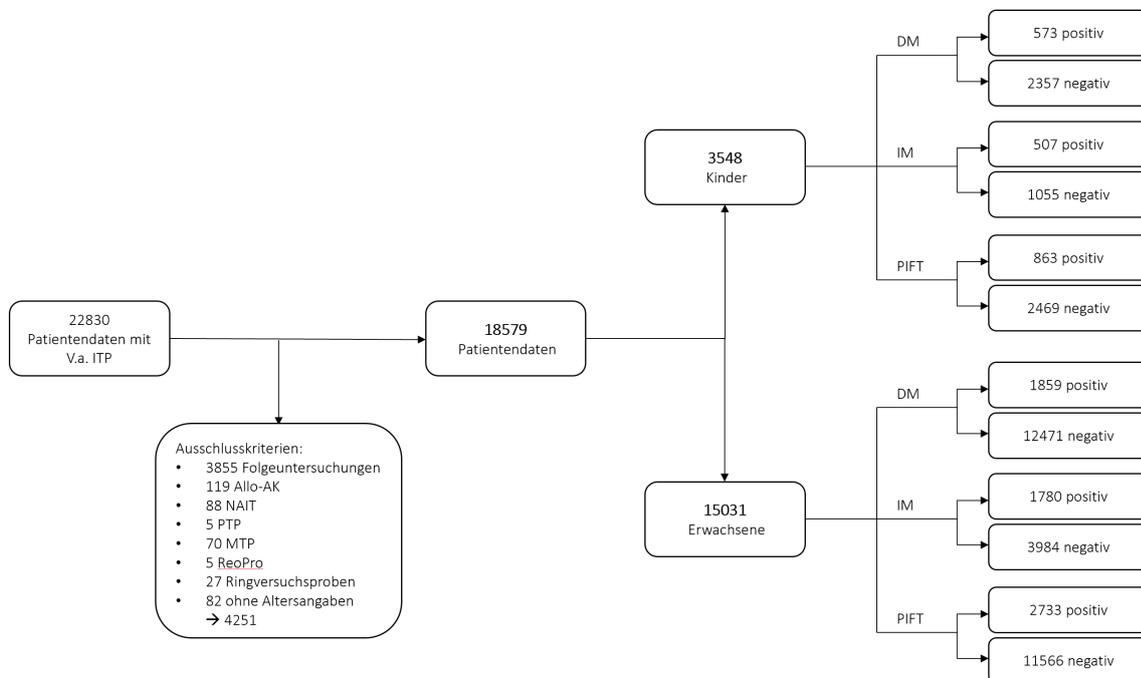


Abbildung 7: Patientenkollektiv mit Verdachtsdiagnose ITP

Anzahl der untersuchten Patientendaten mit V.a. ITP, inkl. Ausschlusskriterien und Bildung der untersuchten Kohorten Kinder und Erwachsene. Nach Maßgabe der immunhämatologischen Befunde wurden die Kohorten in die Gruppen direkter MAIPA (DM) positiv und negativ, indirekter MAIPA (IM) positiv und negativ und Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT) positiv und negativ eingeteilt. Abkürzungen Ausschlusskriterien siehe Text.

2.2 Labormethoden

Alle Untersuchungen wurden vom Thrombozytenlabor des Instituts für Klinische Immunologie, Transfusionsmedizin und Hämostaseologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach den Arbeitsanweisungen der einzelnen Methoden [107–110].

Alle Laborproben wurden mit dem Untersuchungsprofil „Immunthrombozytopenie“ analysiert (Thrombozytenzahl (Counter); direkter MAIPA für die Glykoproteine IIb/IIIa, Ib/IX und V; PIFT und PIFT-Stärke). Sofern logistisch möglich, wurden die Untersuchungen in der in Abbildung 8 angegebenen Reihenfolge durchgeführt.

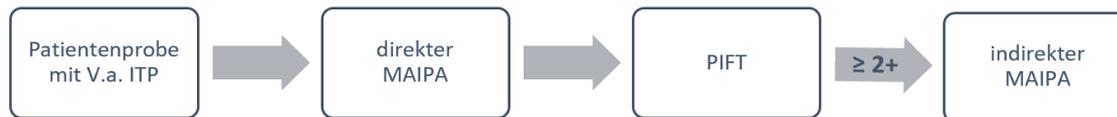


Abbildung 8: Reihenfolge der Laboruntersuchungen des Untersuchungsprofils ‚V.a. Immunthrombozytopenie‘ im Thrombozytenlabor des Instituts für Klinische Immunologie, Transfusionsmedizin und Hämostaseologie am UKGM.

Zuerst wurde bei der Patientenprobe mit V.a. ITP der direkte MAIPA, dann der PIFT durchgeführt. Falls dieser $\geq 2+$ war, wurde zusätzlich der indirekte MAIPA durchgeführt.

Bei den Patientenproben mit V.a. ITP wurde zunächst der direkte MAIPA für die Glykoproteine IIb/IIIa, Ib/IX und V und dann der PIFT durchgeführt. Bei Patientenproben, die ein zweifach oder höher positives Testergebnis ($\geq 2+$) im PIFT hatten, wurde zusätzlich der indirekte MAIPA für die Glykoproteine GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa durchgeführt (*siehe* Abbildung 8). Eine zu geringe Thrombozytenzahl für den direkten MAIPA resultierte bei einem Teil der Patienten darin, dass der indirekte MAIPA durchgeführt wurde, auch wenn das Testergebnis im PIFT $< 2+$ war. Bei einigen Patienten wurde der indirekte MAIPA auch ohne Testergebnis im PIFT durchgeführt, da die Durchführung des PIFTs nur einmal wöchentlich erfolgte.

2.2.1 monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA)

Der ‚monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens‘ (MAIPA) ist ein glykoproteinspezifischer Enzymimmuntest, der dem Nachweis von thrombozytären Antikörpern dient. Die ursprünglich von Volker Kiefel entwickelte Methode stellt heute den Goldstandard hierfür dar [43].

Man unterscheidet den direkten und den indirekten MAIPA. Der direkte MAIPA dient dem Nachweis von thrombozytär gebundenen Antikörpern, wohingegen der indirekte MAIPA frei im Serum vorhandene Antikörper detektieren kann [108, 109].

Direkter MAIPA

Im direkten MAIPA kann eine erhöhte Immunglobulinbeladung der autologen Thrombozyten nachgewiesen werden. Die Durchführung erfolgte nach der Arbeitsanweisung des Thrombozytenlabors (*siehe* Abbildung 9) [108].

Vor der Testdurchführung wurde pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte 100 μ l Puffer (Coatingpuffer + Ziege Anti-Maus IgG (1:500)) hinzugegeben. Das Beschichten der Platte erfolgte über Nacht in einer geeigneten Lagerstätte oder am gleichen Tag bei 37 °C für 3 Stunden. Aus mit EDTA antikoaguliertem Blut wurde das Thrombozytenpellet gewonnen [107]. Die isolierten Patiententhrombozyten wurden dann am Zell-Counter (Kleines Blutbild: Sysmex KX 21 N und dem K) gezählt und errechnet, wie viel μ l benötigt werden, um 20 Millionen Zellen zu erhalten.

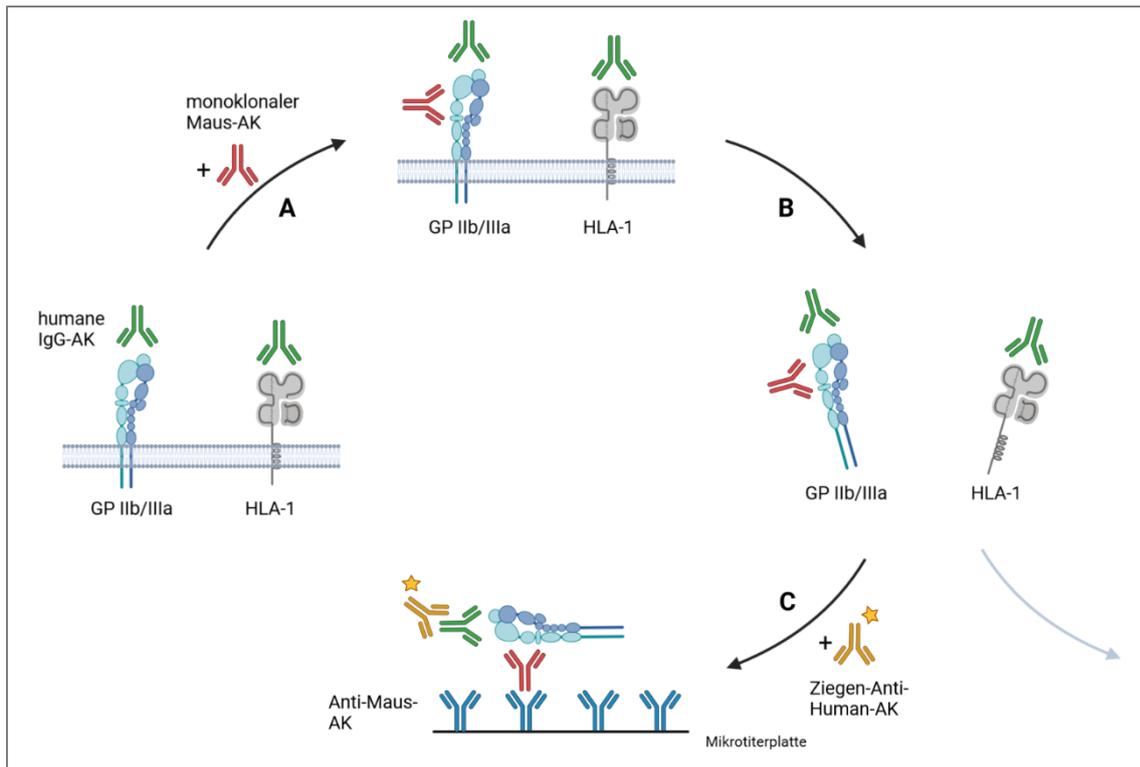


Abbildung 9: Testprinzip des direkter MAIPA

Humane IgG-Antikörper (grün) können mit Glykoproteinkomplexen (hier beispielhaft GP IIb/IIIa dargestellt) und HLA I-Molekülen der Thrombozytenmembran reagieren. **(A)** Um die glykoproteinspezifischen Autoantikörper im direkten MAIPA nachzuweisen, werden die Patiententhrombozyten mit einem glykoproteinspezifischen monoklonalen Maus-Antikörper (rot) inkubiert. **(B)** Die Thrombozyten werden solubilisiert, wobei die beladenen Glykoproteinkomplexe nicht zerstört werden. **(C)** Das Lysat wird auf eine mit Anti-Maus-Antikörper (blau) beschichtete Mikrotiterplatte übertragen; dabei werden die monoklonalen-Maus-AK-markierten Glykoproteinkomplexe fixiert, die HLA-I-Moleküle gehen verloren. Ein Peroxidase-markierter Ziegen-Anti-Human-Antikörper (gelb) wird hinzugegeben, um die Reaktion sichtbar zu machen. *Created with Biorender.com (in Anlehnung an [46]).*

Die 20 Millionen Patiententhrombozyten wurden dann in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 1 Minute bei 10.000 upm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Thrombozyten in 30 µl PBS 2 % BSA resuspendiert. Danach wurden in drei verschiedenen Ansätzen je 10 µl der monoklonalen Antikörper gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V hinzu pipettiert. Diese lagerten sich während der Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C an die entsprechenden Glykoproteinkomplexe an. Die nichtgebundenen Bestandteile wurden durch dreimaliges Waschen mit 100 µl physiologischer Kochsalzlösung, anschließender Zentrifugation (1 Minute bei 10.000 upm) und Entfernen des Überstands entfernt. Der Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Absaugen wurden die Thrombozytenpellets in 100 µl Solubilisationspuffer resuspendiert, wodurch die Lyse stattfand und die Kontinuität der Membran aufgelöst wurde. Die Glykoproteinkomplexe wurden nicht zerstört und diejenigen, die monoklonale Antikörper gebunden hatten, wurden durch polyspezifische Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper, die an die Mikrotiterplatte gebunden waren, immobilisiert. Während der sich anschließenden Inkubationszeit von

30 Minuten bei 4 °C wurde die Mikrotiterplatte viermalig mit 200 µl Tris-Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen, danach erneut 200 µl Waschpuffer hinzugegeben und mindestens 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Dadurch wurden Glykoproteinkomplexe, die nicht mit monoklonalen Antikörpern beladen waren, entfernt und unspezifische Bindungsstellen blockiert. Im Anschluss wurde die Suspension für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (13.000 upm), 50 µl Überstand abpipettiert und wieder in 200 µl Tris-Waschpuffer resuspendiert. Die geblockte Mikrotiterplatte wurde dann ausgeklopft und je 100 µl des verdünnten Überstands wieder hinzu pipettiert. Alle Proben (Patientenproben, Kontrollen, Blank) wurden im Doppelwert analysiert. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten bei 4 °C und viermaligen Waschen mit je 200 µl Tris-Waschpuffer wurde in jedes Vertiefung 100 µl Peroxidase markiertes Ziege-Anti-Human IgG pipettiert. Dieser enzymmarkierte Antikörper lagerte sich an den in vivo gebundenen Antikörper an. Danach erfolgte eine Inkubation von 120 Minuten bei 4 °C mit anschließendem viermaligem Waschen mit je 200 µl Tris-Waschpuffer. Zuletzt wurde pro Vertiefung 100 µl Substratpuffer (TMB One) hinzugegeben und die Reaktion nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln mit 50 µl 2,5 N H₂SO₄ gestoppt.

Die photometrische Messung der Extinktionswerte/OD-Werte (optische Dichte) fand direkt im Anschluss am Photometer (Sunrise-TECAN) bei 450 nm und 620 nm statt. Es wurde der Mittelwert der Blank-OD-Werte gebildet und dieser von den Patienten-OD-Werten abgezogen. Die erhaltenen OD-Werte wurden, wie in Tabelle 6 dargestellt, eingeordnet und das Ergebnis sowohl auf dem Testprotokoll als auch im Computer dokumentiert. Bestimmte Kriterien mussten erfüllt sein, um eine analytische Freigabe der Ergebnisse zu ermöglichen: Blank-OD-Werte mussten $\leq 0,150$ sein, die Einzelwerte des Doppelansatzes sollten nicht mehr als 20 % voneinander abweichen und für jeden verwendeten monoklonalen Antikörper musste eine Positivkontrolle durchgeführt werden, deren OD-Wert nicht unter 1,0 liegen sollte.

Da pro Ansatz 20 Millionen Thrombozyten nötig waren, konnten nicht bei jedem Patienten alle drei Glykoproteinkomplexe untersucht werden. Die Reihenfolge der untersuchten Glykoproteinkomplexe war folgende: 1. GP IIb/IIIa, 2. GP Ib/IX, 3. GP V.

Tabelle 6: Bewertung der photometrischen Messung beim direkten/indirekten MAIPA
 Berechnet nach: OD = OD Test – OD Blank, OD = optische Dichte

OD-Wert	Einordnung	Bewertung
< 0,150	∅	Negativ
0,15-0,20	(+)	Grenzwertig
0,21-0,40	+	Schwach positiv
0,41-0,80	++	Mäßig positiv
0,81-1,20	+++	Deutlich positiv
1,21-4	++++	Stark positiv

Indirekter MAIPA

Der indirekte MAIPA dient der Differenzierung und Charakterisierung der freien Antikörper im Serum bzw. im plättchenfreien Plasma. Er wurde im Anschluss an den PIFT durchgeführt (siehe Abbildung 8). Die Durchführung des Tests erfolgte entsprechend der Arbeitsanweisung des Thrombozytenlabors [109].

Im Gegensatz zum direkten MAIPA wurden beim indirekten MAIPA humane Testthrombozyten mit bekannter Antigenstruktur verwendet und mit dem Patientenserum, welches die gesuchten Antikörper enthielt, zusammen pipettiert und untersucht.

Zur Vorbereitung wurde pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte 100 µl Puffer (Coatingpuffer + Ziege Anti-Maus IgG, 1:500) hinzugegeben. Das Beschichten der Platte erfolgte über Nacht in einer geeigneten Lagerstätte oder am gleichen Tag bei 37 °C für mind. 2 Stunden. Aus mit EDTA antikoaguliertem Blut oder Nativ-Blut wurde das plättchenfreie Plasma bzw. Serum gewonnen [107]. 20 Millionen Testthrombozyten wurden am Zell-Counter (Kleines Blutbild: Sysmex KX 21 N und dem K) gezählt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die Patientenprobe und die Spenderthrombozyten wurden vor Testbeginn für 1 Minute bei 10.000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Thrombozyten in 30 µl PBS 2 % BSA resuspendiert. 50 µl des Serums bzw. Plasmas wurden dazu pipettiert und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Platte einmal mit 100 µl physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und erneut für 1 Minute bei 10.000 upm zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurden die Thrombozyten in 30 µl PBS 2 % BSA resuspendiert. Anschließend wurden in drei verschiedenen Ansätzen je 10 µl der monoklonalen Antikörper gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa hinzugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C und einer

dreimaligen Waschung mit 100 µl physiologischer Kochsalzlösung wurde die Mikrotiterplatte für 1 Minute bei 10.000 upm zentrifugiert. Danach erfolgte die Testdurchführung analog dem direkten MAIPA [43, 108]. Die Messung erfolgte anschließend photometrisch bei 450 nm und 620 nm und die Ergebnisse wurden wie beim direkten MAIPA bewertet und dokumentiert (*siehe* Abschnitt „direkter MAIPA“ und Tabelle 6). Auch die zu erfüllenden Kriterien zur analytischen Freigabe der Ergebnisse entsprachen denen des direkten MAIPAs. Die Differenzierung zwischen Allo- und Auto-Antikörpern erfolgte durch das Reaktionsmuster der verschiedenen Testzellen. Für den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa gab es drei, für die Glykoproteinkomplexe GP Ib/IX und GP V zwei Testzellen. Reagierten alle Testzellen eines Glykoproteins mit dem Patienten-serum positiv, so handelte es sich um Auto-AK, da diese glykoproteinspezifisch, jedoch nicht HPA-spezifisch sind. Reagierte hingegen nur ein Teil der Testzellen eines Glykoproteins mit dem Patientenserum, so handelte es sich um Allo-AK, da diese HPA- und glykoproteinspezifisch sind.

2.2.2 Platelet Immunofluorescence Test (PIFT)

Der Plättchen-Adhäsions-Immunfluoreszenztest (PAIFT), im engl. „Platelet Immunofluorescence Test“ (PIFT), ist ein Immunfluoreszenztest, der dem Nachweis von thrombozytären Antikörpern dient [110].

Die ursprüngliche Methode des Plättchen-Suspensions-Immunfluoreszenztest (PSIFT) [114], bei dem die Thrombozyten als Zellsuspension vorliegen, wurde von Schneider & Schnaidt modifiziert [96]. Dabei wird die Fähigkeit von Thrombozyten, an Glasobjektträger zu adhären, genutzt. Man unterscheidet den direkten und den indirekten PIFT. Der direkte PIFT weist thrombozytär gebundene Antikörper, der indirekte PIFT frei im Plasma vorhandene Antikörper nach.

Der PIFT wurde im Anschluss an den direkten MAIPA nach der Arbeitsanweisung des Thrombozytenlabors durchgeführt [110]. Bei den untersuchten Patientenproben wurde nur der indirekte PIFT durchgeführt.

Vorbereitung:

Für den Test benötigt man fünf verschiedene HPA-typisierte Testthrombozyten, welche so gewählt wurden, dass die Antikörperspezifitäten unterschieden werden konnten. Die in Stickstoff gelagerten Testthrombozyten wurden entsprechend dem Protokoll entnommen und reaktiviert. Die Ampullen wurden im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, die Zellsuspensionen anschließend in Polyröhrchen umgefüllt, mit NaCl pH 6,5 aufgefüllt und für 10 Minuten bei 3.000 upm zentrifugiert (Rotina 46 Hettich-Zentrifuge). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpelett mit 1 ml NaCl pH 6,5

resuspendiert und die Zellzahl am Counter (Kleines Blutbild: Sysmex KX 21 N und dem K) bestimmt. Die Zellsuspensionen wurden auf 200.000 Thrombozyten/ μ l eingestellt.

Die Patientenproben wurden analog der Testthrombozyten aufgetaut und bei 3.000 upm für 10 Minuten zentrifugiert und zu je 100 μ l aliquotiert.

Vor Beginn des Tests wurden nochmals alle Serum-Proben für 1 Minute bei 10.000 upm zentrifugiert.

Testdurchführung:

Auf eine Hamaxplatte werden die Testthrombozyten senkrecht angeordnet und die Patientenserum sowie die Kontrollen waagrecht angeordnet pipettiert. Pro Ring der Hamaxplatte wurden 10 μ l der fünf verschiedenen HPA-typisierten Testthrombozyten pipettiert. Nach Sedimentation für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Überstand zur Hälfte abgesaugt. Zu den adhärenen Thrombozyten wurden nun pro Ring 10 μ l des Patientenserums/plättchenfreien Plasmas hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit den Thrombozyten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit NaCl pH 6,5 wurden 10 μ l des FITC-markierten Anti-Human-Antikörpers (1:50 in PBS, pH 6.5) pro Ring hinzugegeben. Die Antigen-Antikörper-Reaktion von adhärenen Thrombozyten mit humanen thrombozytären Antikörpern wird durch diesen sichtbar gemacht. Die Platte wurde nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln zweimal gewaschen und anschließend 10 μ l Glycerin PBS (pH 6.5, 1:3) pro Ring pipettiert.

Die Auswertung der Reaktion erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit einem 100er Öl-Objektiv. Die Reaktionsstärke wurde nach einem semiquantitativen Score (0, 1+, 2+, 3+, 4+) eingeteilt. Je nach Reaktionsmuster konnte auf das Vorliegen eines bestimmten thrombozytären Antikörpers geschlossen werden. Die Ergebnisse wurden im Computer und auf dem Testprotokoll dokumentiert. Um eine analytische Freigabe der Ergebnisse zu ermöglichen, mussten eine Positiv-Kontrolle und eine Negativ-Kontrolle vorliegen. Bei der Positiv-Kontrolle mussten bekannte HPA-1a-Antikörper ohne HLA-Antikörper eine Fluoreszenzstärke von 3-4 zeigen und das HPA-1a-Standardserum (NIBSC) in Verdünnung 1:8 zweifach positiv mit den antigenträgenden Zellen reagieren. Bei der Negativ-Kontrolle musste ein bekanntes Serum in der Fluoreszenzstärke negativ sein.

2.3 Statistische Methoden

Die Daten wurden mit den Programmen Excel (Microsoft Office Home and Business 2016) und Prism 9 (GraphPad Prism version 9.3.1 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA) verwaltet, analysiert und dargestellt.

Um eine statistische Analyse zu ermöglichen, wurden die Datensätze der Excel-Tabelle vorab umkodiert.

Die Hauptvariable zur Überprüfung der Fragestellung war die Thrombozytenzahl (G/L). Nach Ausschluss des Vorliegens einer Normalverteilung der Thrombozytenzahl mittels D'Agostino & Pearson Test, Shapiro-Wilk Test und Kolmogorov-Smirnov Test in GraphPad, wurden nichtparametrische Tests verwendet.

Zur Analyse von zwei Datensätzen bzw. Gruppen wurde der Mann-Whitney U Test (two sided) verwendet. Bei der Analyse von mehr als zwei Datensätzen bzw. Gruppen wurde der Kruskal-Wallis Test angewandt.

2.4 Ethikvotum

Die Analyse der vorliegenden Daten wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Giessen am 02.04.2009 bewilligt (Az.: 08/06, Titel: Datensammlung bei Patienten mit der Verdachtsdiagnose Autoimmunthrombozytopenie (ITP) unter Heranziehung der Arztbriefe).

3. Ergebnisse

3.1 Patientendaten

3.1.1 Kohorten und Gruppen

Die 18.579 Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP wurden in die Kohorten Kinder und Erwachsene aufgeteilt. Die Kohorte der Kinder (0-18 Jahre) umfasste 3.548 Patienten (19,10 %), die der Erwachsenen (19-100 Jahre) 15.031 (80,90 %) (siehe Abbildung 10).

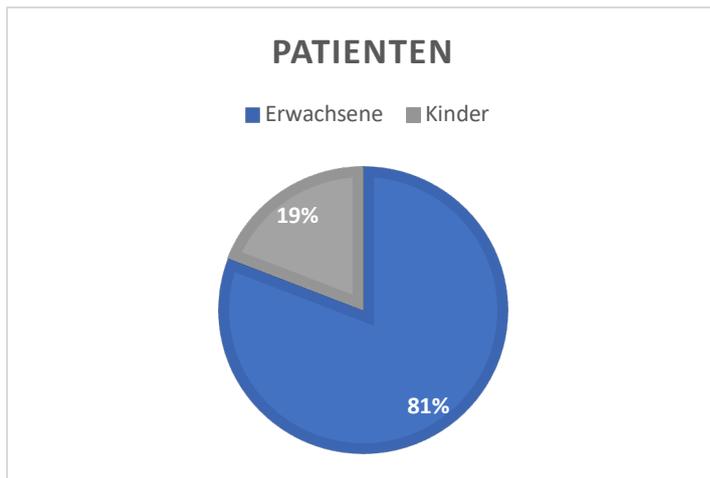


Abbildung 10: Anteil der Kinder und Erwachsenen der untersuchten Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP

Für die einzelnen Untersuchungen wurden Kinder und Erwachsene anhand ihrer immunhämatologischen Befunde aus dem direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V), dem indirekten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa) sowie dem Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT) in verschiedene Gruppen eingeteilt.

Kinder und Erwachsene mit einem positiven Testergebnis für mindestens einen oder negativen Testergebnis für alle drei der untersuchten Glykoproteinkomplexe im direkten MAIPA (DM) (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V) oder indirekten MAIPA (IM) (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa) oder einem positiven oder negativen Testergebnis im Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT) sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 dargestellt.

Die Zusammensetzung der jeweils untersuchten Gruppen wird in den einzelnen Kapiteln erläutert.

3.1.2 Demographische Daten

Bei den Analysen wurden fehlende Werte der Thrombozytenzahl (G/L), sowie fehlende Angaben beim direkten MAIPA, indirekten MAIPA und Plättchenimmunfluoreszenztest ausgeschlossen. Die angegebenen Prozentsätze spiegeln die jeweils untersuchte Gruppe wider.

Der Anteil der fehlenden Werte der Thrombozytenzahl war bei den Gesamtkohorten Kinder 6,74 % (239) und Erwachsene 5,28 % (793). Bei 3 Erwachsenen (0,002 %) mit positivem Testergebnis und 19 Erwachsenen mit negativem Testergebnis (0,002 %) im direkten MAIPA konnte die Thrombozytenzahl nicht bestimmt werden, bei 3 Kindern (0,002 %) mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA fehlte die Angabe der Thrombozytenzahl. Bei Patienten mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA gab es folgende fehlende Werte: positiv = Kinder: 56 (11,05 %), Erwachsene 223 (12,53 %); negativ = Kinder: 91 (14,04 %), Erwachsene 308 (12,59 %). Bei Patienten mit positivem Testergebnis im Plättchenimmunfluoreszenztest war die Anzahl der fehlenden Werte folgende: Kinder 42 (4,87 %), Erwachsene 149 (5,45 %). Bei Patienten mit negativem Testergebnis im Plättchenimmunfluoreszenztest fehlte bei 194 Kindern (7,29 %) und 629 Erwachsenen (5,44 %) eine Angabe der Thrombozytenzahl. Siehe Tabelle 7 und Tabelle 8. Die im Folgenden genannte Anzahl der Patienten bezieht sich auf Patienten, bei denen eine Angabe der Thrombozytenzahl vorlag.

Der Anteil der fehlenden Angaben bei den einzelnen, untersuchten Glykoproteinkomplexen im direkten MAIPA, indirekten MAIPA und PIFT werden in Kapitel 3.2, 3.3, und 3.4 dargestellt.

Bei den Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP lag der Altersmedian bei 9 (IQR 4-14) Jahren (*siehe* Tabelle 7). Insgesamt gab es 1.620 weibliche (45,66 %) und 1.928 männliche (54,34 %) Patienten. Bei den Patientengruppen mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA (DM positiv) gab es 287 (50,09 %) weibliche und 286 (49,91 %) männliche Patienten; bei Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA waren 623 (45,24 %) weiblich und 754 (54,76 %) männlich. Bei Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA (IM positiv) waren es 226 (44,58 %) weibliche und 281 (55,42 %) männliche Patienten; mit negativem Testergebnis im indirekten MAIPA 286 (44,14 %) weibliche und 362 (55,86 %) männliche Patienten. Bei Kindern mit positivem Testergebnis im Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT positiv) gab es 400 (46,35 %) weibliche und 463 (53,65 %) männliche Patienten; mit negativem Testergebnis im PIFT 1.212 (45,51 %) weibliche und 1.451 (54,49 %) männliche Patienten.

Tabelle 7: Demographische Daten Kinder mit Verdachtsdiagnose ITP

* Direkter MAIPA (DM) positiv/negativ: GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V; positiv = mindestens ein Glykoprotein positiv; negativ = alle drei Glykoproteine negativ.

° Indirekter MAIPA (IM) positiv/negativ: GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa; positiv = mindestens ein Glykoprotein positiv; negativ = alle drei Glykoproteine negativ.

§ Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT) positiv/negativ.

	Gesamt (n=3548)	DM *		IM °		PIFT §	
		positiv (n=573)	negativ (n=1377)	positiv (n=507)	negativ (n=648)	positiv (n=863)	negativ (n=2663)
Geschlecht							
weiblich - n	1620	287	623	226	286	400	1212
(%)	(45,66)	(50,09)	(45,24)	(44,58)	(44,14)	(46,35)	(45,51)
männlich - n	1928	286	754	281	362	463	1451
(%)	(54,34)	(49,91)	(54,76)	(55,42)	(55,86)	(53,65)	(54,49)
fehlende Werte (n)	-	-	-	-	-	-	-
Alter (Jahre)							
Median	9	11	11	9	8	9	10
	4-14	6-15	6-15	3-14	3-13	3-14	4-14
Interquartilsabstand	1-18	1-18	1-18	1-18	1-18	1-18	1-18
Spannweite							
Thrombozytenzahl (G/L) (Counter)							
Median	53	39	97,5	23	31	40	58
Median (w/m)	52/54	40/38,5	89/104	26/23	31,5/30	42/37	54/60
Spannweite	0-735	1-582	5-735	0-648	0-735	0-648	0-735
	20-109	20-78,5	58-154	9-64	13-76,5	15-89	23-115
Interquartilsabstand	239	0	3	56	91	42	194
fehlende Werte - n	(6,74)		(0,002)	(11,05)	(14,04)	(4,87)	(7,29)
(%)							

Bei den Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP lag der Altersmedian bei 60 (IQR 43-72) Jahren (siehe Tabelle 8). 7.088 (47,16 %) der Patienten waren weiblich, 7.943 (52,84 %) männlich. Bei den Patientengruppen mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA (DM positiv) gab es 973 (52,34 %) weibliche und 886 (47,66 %) männliche Patienten; bei Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA waren 5.856 (46,96 %) weiblich und 6.615 (53,04 %) männlich. Bei Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA (IM positiv) waren es 950 (53,37 %) weibliche und 830 (46,63 %) männliche Patienten. 2.092 (52,51 %) weibliche und 1.892 (47,49 %) männliche Patienten hatten ein negatives Testergebnis im indirekten MAIPA. Bei den Erwachsenen mit positivem Testergebnis im Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT positiv) gab es 1.432 (52,40 %) weibliche und 1.301 (47,60 %) männliche Patienten; mit negativem Testergebnis im PIFT gab es 5.592 (45,85 %) weibliche und 6.603 (54,15 %) männliche Patienten.

Tabelle 8: Demographische Daten Erwachsene mit Verdachtsdiagnose ITP

* Direkter MAIPA (DM) positiv/negativ: GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V; positiv = mindestens ein Glykoprotein positiv; negativ = alle drei Glykoproteine negativ.

° Indirekter MAIPA (IM) positiv/negativ: GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa; positiv = mindestens ein Glykoprotein positiv; negativ = alle drei Glykoproteine negativ.

§ Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT) positiv/negativ.

	Gesamt (n=15031)	DM *		IM °		PIFT §	
		positiv (n=1859)	negativ (n=9172)	positiv (n=1780)	negativ (n=2446)	positiv (n=2733)	negativ (n=12195)
Geschlecht							
weiblich - n	7088	973	4289	950	1274	1432	5592
(%)	(47,16)	(52,34)	(46,76)	(53,37)	(52,09)	(52,40)	(45,85)
männlich - n	7943	886	4883	830	1172	1301	6603
(%)	(52,84)	(47,66)	(53,24)	(46,63)	(47,91)	(47,60)	(54,15)
fehlende Werte (n)	-	-	-	-	-	-	-
Alter (Jahre)							
Median	60	60	60	59	57	59	61
Interquartilsabstand	43-72	42-73	43-71	41,25-73	36-71	41-75	44-72
Spannweite	19-99	19-93	19-97	19-94	19-99	19-97	19-99
Thrombozytenzahl (G/L) (Counter)							
Median	74	48	88	46	64	59,5	76
Median (w/m)	76/71	50/47	91/85	51/39	73/53	60/59	79/74
Spannweite	0-1909	0-667	0-1909	0-886	0-1773	0-1773	0-1909
Interquartilsabstand	36-115	21-86	55-124	12-94	20,75-109	23-105	39-116
fehlende Werte - n	793	3	19	223	308	149	629
(%)	(5,28)	(0,002)	(0,002)	(12,53)	(12,59)	(5,45)	(5,16)

3.1.3 Thrombozytenzahl: Häufigkeitsverteilung

Die Analyse der Häufigkeitsverteilung der Thrombozytenzahl wurde für Kinder und Erwachsene getrennt vorgenommen; ferner erfolgte eine Stratifizierung der Häufigkeitsverteilung nach Maßgabe der immunhämatologischen Befunde.

3.1.3.1 Die Thrombozytenzahl war bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP niedriger als bei Erwachsenen.

Die absolute Häufigkeitsverteilung der Thrombozytenzahl für die Gesamtgruppe der Kinder und Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP ist in Abbildung 11 dargestellt. Bei den Kindern ergab sich eine linksgipflige Verteilung mit einem Median bei 53 G/L Thrombozyten (IQR 20-109 G/L) (siehe Tabelle 7). Bei den Erwachsenen war die Verteilung ebenfalls linksgipflig; der Median lag bei 74 G/L Thrombozyten (IQR 36-115 G/L) (siehe Tabelle 8). Im Vergleich zu den Erwachsenen zeigten Kinder statistisch signifikant niedrigere Thrombozytenzahlen ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test). Bei den weiblichen Erwachsenen lag der Median der Thrombozytenzahl mit 76 G/L (IQR 38-120 G/L) signifikant höher als bei den männlichen Patienten mit 71 G/L (IQR 34-111 G/L) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test). Die Thrombozytenzahl bei weiblichen und männlichen Kindern unterschied sich nicht signifikant ($P > 0,05$, Mann-Whitney Test).

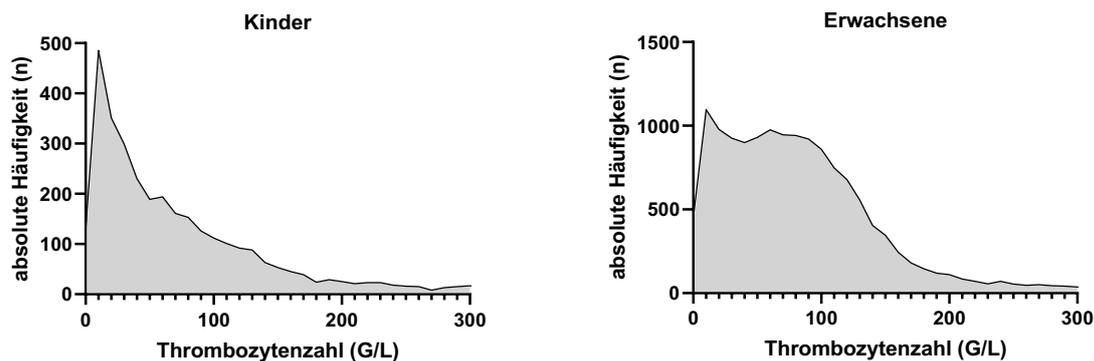


Abbildung 11: Absolute Häufigkeitsverteilung der Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP

Absolute Häufigkeitsverteilung der Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP (Kinder: n=3309, Erwachsene: n=14238). X-Achse: Thrombozytenzahl (G/L); Y-Achse: absolute Häufigkeit (n). Klassenbreite: 10 G/L Thrombozyten. Mediane Thrombozytenzahl bei Kindern: 53 G/L (IQR 20-109 G/L). Mediane Thrombozytenzahl bei Erwachsenen: 74 G/L (IQR 36-115 G/L). Auf Grund der Skalierung liegen Werte außerhalb des Wertebereichs (Kinder: n=44, Erwachsene n=161).

3.1.3.2 Die Thrombozytenzahl war bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA.

In Abbildung 12 sind die relativen Häufigkeitsverteilungen der Thrombozytenzahl nach dem Testergebnis im direkten MAIPA stratifiziert dargestellt. Bei Patienten mit Verdachtsdiagnose ITP mit positivem Testergebnis waren thrombozytäre Antikörper gegen mindestens einen der drei untersuchten Glykoproteinkomplexe (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V) im direkten MAIPA nachweisbar; bei Patienten mit negativem Testergebnis gegen keinen der drei Glykoproteinkomplexe (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V). Bei den Kindern lag der Median der Thrombozytenzahl bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA bei 39 G/L (IQR: 20-78,5 G/L), bei Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA signifikant höher bei 97,5 G/L (IQR 58-154 G/L) Thrombozyten ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test). Bei den Erwachsenen lag der Median der Thrombozytenzahl bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA bei 48 G/L (IQR 21-86 G/L) und bei Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA signifikant höher bei 88 G/L (IQR 55-124 G/L) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test). In Abbildung 12 wird diese Diskrepanz deutlich durch den Unterschied zwischen der roten und grünen Kurve hervorgehoben; Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA (rote Kurve) haben relativ gesehen einen höheren Anteil bei niedrigen Thrombozytenzahlen als Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA (grüne Kurve).

Die Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit positivem Testergebnis unterschied sich nicht signifikant ($P > 0,05$, Mann-Whitney Test). Der Unterschied der Thrombozytenzahl bei weiblichen und männlichen Kindern und Erwachsenen mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA war ebenfalls nicht signifikant ($P > 0,05$, Mann-Whitney Test).

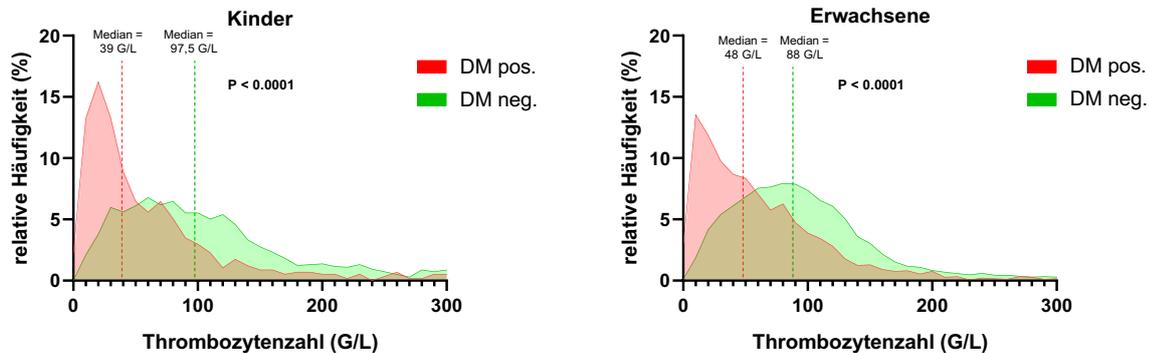


Abbildung 12: Relative Häufigkeitsverteilung der Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA

Relative Häufigkeitsverteilung der Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem (Kinder: $n=573$, Erwachsene $n=1856$) oder negativem (Kinder: $n=1374$, Erwachsene: $n=9153$) Testergebnis im direkten MAIPA (DM). X-Achse: Thrombozytenzahl (G/L); Y-Achse: relative Häufigkeit (%). Klassenbreite: 10 G/L Thrombozyten. DM positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen mindestens einen der Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V nachweisbar. DM negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V nicht nachweisbar. Mediane Thrombozytenzahl bei Kindern: DM positiv: 39 G/L (IQR 20-78,5 G/L), DM negativ: 97,5 G/L (IQR 58-154 G/L) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney U test, two-sided). Mediane Thrombozytenzahl bei Erwachsenen: DM positiv: 48 G/L (IQR 21-86 G/L), DM negativ: 88 G/L (IQR 55-124 G/L) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney U test, two-sided). Auf Grund der Skalierung liegen Werte außerhalb des Wertebereichs (Kinder: $n=88$, Erwachsene $n=322$).

3.1.3.3 Die Thrombozytenzahl war bei Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis im indirekten MAIPA.

In Abbildung 13 sind die relativen Häufigkeitsverteilungen der Thrombozytenzahl nach dem Testergebnis im indirekten MAIPA stratifiziert. Bei Patienten mit Verdachtsdiagnose ITP mit positivem Testergebnis waren freie thrombozytäre Antikörper gegen mindestens einen der drei untersuchten Glykoproteinkomplexe (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa) im indirekten MAIPA nachweisbar; bei Patienten mit negativem Testergebnis gegen keinen der drei Glykoproteinkomplexe (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa). Bei den Kindern lag der Median der Thrombozytenzahl bei Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA bei 23 G/L Thrombozyten (IQR 9-64 G/L), bei Patienten mit negativem Testergebnis im indirekten MAIPA bei 31 G/L (IQR 13-76,5 G/L). Patienten mit negativem Testergebnis im indirekten MAIPA hatten signifikant höhere Thrombozytenzahlen; der P-Wert im Mann-Whitney Test lag

bei 0,0055. Bei den Erwachsenen lag der Median der Thrombozytenzahl bei Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA bei 46 G/L Thrombozyten (IQR 12-94 G/L), bei Patienten mit negativem Testergebnis im indirekten MAIPA bei 64 G/L (IQR 20,75-109 G/L). Die Differenz der Thrombozytenzahl bei Patienten mit positivem und negativem Testergebnis im indirekten MAIPA war auch bei Erwachsenen signifikant ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test). Der Unterschied der Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA war statistisch signifikant ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test). In Abbildung 13 wird diese Diskrepanz durch den Unterschied zwischen der roten und grünen Kurve hervorgehoben; Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA (rote Kurve) haben relativ gesehen einen höheren Anteil bei niedrigen Thrombozytenzahlen als Patienten mit negativem Testergebnis im indirekten MAIPA (grüne Kurve).

Bei den weiblichen Erwachsenen mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA lag der Median der Thrombozytenzahl mit 51 G/L (IQR 15-100 G/L) signifikant höher als bei den männlichen Patienten mit 39 G/L (IQR 10-88 G/L) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test). Die Thrombozytenzahl bei weiblichen und männlichen Kindern mit positivem Testergebnis unterschied sich nicht signifikant ($P > 0,05$, Mann-Whitney Test).

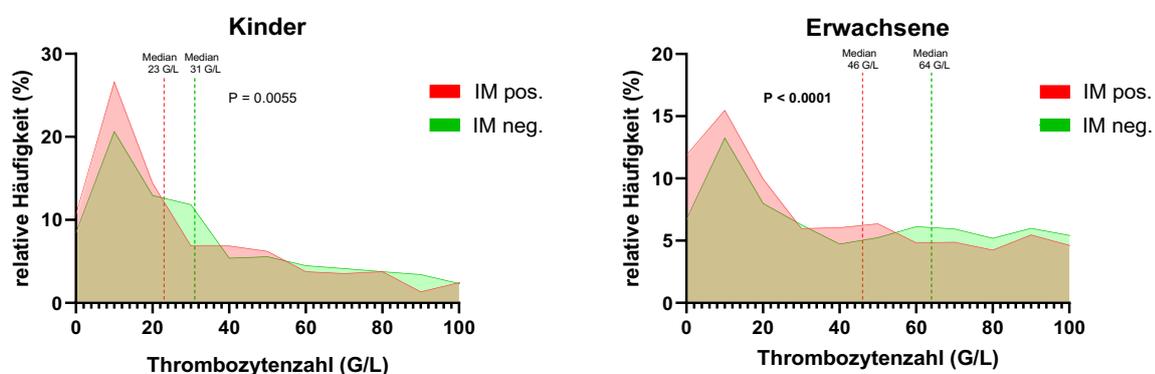


Abbildung 13: Relative Häufigkeitsverteilung der Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA

Relative Häufigkeitsverteilung der Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem (Kinder: $n=451$, Erwachsene $n=1557$) oder negativem (Kinder: $n=557$, Erwachsene: $n=2138$) Testergebnis im indirekten MAIPA (IM). X-Achse: Thrombozytenzahl (G/L); Y-Achse: relative Häufigkeit (%). Klassenbreite: 10 G/L Thrombozyten. IM positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen mindestens einen der Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/IIa nachweisbar. IM negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa nicht nachweisbar. Mediane Thrombozytenzahl bei Kindern: IM positiv: 23 G/L (IQR 9-64 G/L), IM negativ: 31 G/L (IQR 13-76,5 G/L) ($P=0,0055$, Mann-Whitney U test, two-sided). Mediane Thrombozytenzahl bei Erwachsenen: IM positiv: 46 G/L (IQR 12-94 G/L), IM negativ: 64 G/L (IQR 20,75-109 G/L) ($P<0,0001$, Mann-Whitney U test, two-sided). Auf Grund der Skalierung liegen Werte außerhalb des Wertebereichs (Kinder: $n=128$, Erwachsene $n=334$).

3.1.3.4 Die Thrombozytenzahl war bei Patienten mit positivem Testergebnis im Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT) niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis im Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT).

Nach dem Testergebnis im PIFT stratifiziert, ergab die Analyse der Thrombozytenzahl die in Abbildung 14 dargestellte, relative Häufigkeitsverteilung. Bei Patienten mit Verdachtsdiagnose ITP mit positivem Testergebnis waren thrombozytäre Antikörper im PIFT nachweisbar; bei Patienten mit negativem Testergebnis wurden keine thrombozytären Antikörper im PIFT nachgewiesen. Bei den Kindern lag der Median der Thrombozytenzahl bei Patienten mit positivem Testergebnis im PIFT bei 40 G/L (IQR 15-89 G/L), bei Patienten mit negativem Testergebnis im PIFT signifikant höher bei 58 G/L (IQR 23-115 G/L) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test). Bei den Erwachsenen lag der Median der Thrombozytenzahl bei Patienten mit positivem Testergebnis im PIFT bei 59,5 G/L (IQR 23-105 G/L), bei Patienten mit negativem Testergebnis im PIFT signifikant höher bei 76 G/L (IQR 39-116 G/L) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test). In Abbildung 14 wird diese Diskrepanz durch die Gegenüberstellung der roten und grünen Kurve hervorgehoben; Patienten mit positivem Testergebnis im PIFT (rote Kurve) haben relativ gesehen einen höheren Anteil bei niedrigen Thrombozytenzahlen als Patienten mit negativem Testergebnis im PIFT (grüne Kurve).

Die Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit positivem Testergebnis im PIFT unterschied sich signifikant ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test). Der Unterschied der Thrombozytenzahl bei weiblichen und männlichen Kindern und Erwachsenen mit positivem Testergebnis im PIFT war nicht signifikant ($P > 0,05$, Mann-Whitney Test).

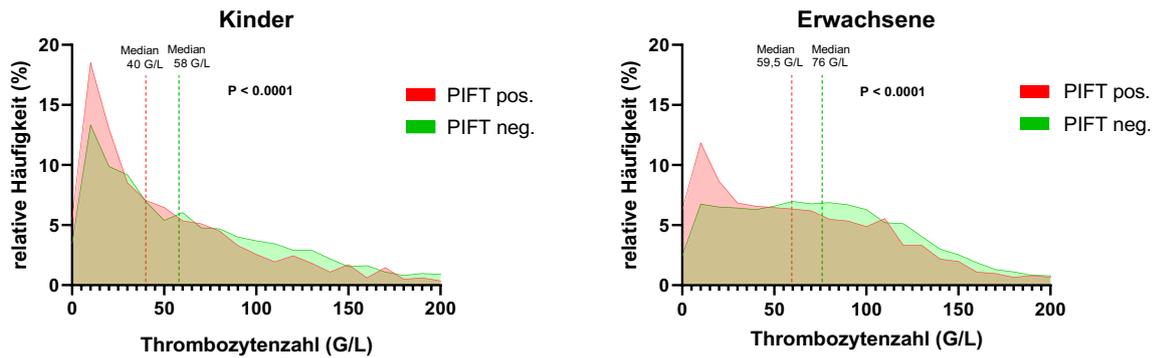


Abbildung 14: Relative Häufigkeitsverteilung der Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im Plättchenimmunfluoreszenztest

Relative Häufigkeitsverteilung der Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem (Kinder: n=821, Erwachsene n=2584) oder negativem (Kinder: n=2469, Erwachsene: n=11566) Testergebnis im Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT). X-Achse: Thrombozytenzahl (G/L); Y-Achse: relative Häufigkeit (%). Klassenbreite: 10 G/L Thrombozyten. PIFT positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper nachweisbar. PIFT negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper nicht nachweisbar. Mediane Thrombozytenzahl bei Kindern: PIFT positiv: 40 G/L (IQR 15-89 G/L), PIFT negativ: 58 G/L (IQR 23-115 G/L) ($P < 0.0001$, Mann-Whitney U test, two-sided). Mediane Thrombozytenzahl bei Erwachsenen: PIFT positiv: 59,5 G/L (IQR 23-105 G/L), PIFT negativ: 76 G/L (IQR 39-116 G/L) ($P < 0.0001$, Mann-Whitney U test, two-sided). Auf Grund der Skalierung liegen Werte außerhalb des Wertebereichs (Kinder: n=108, Erwachsene n=342).

3.2 Direkter MAIPA

Die Durchführung des direkten MAIPAs benötigt pro Ansatz 20 Millionen Thrombozyten; bei Patienten mit sehr niedrigen Thrombozytenzahlen konnte der direkte MAIPA daher nicht für alle drei Glykoproteinkomplexe (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V) durchgeführt werden. Bei limitierter Thrombozytenzahl wird der direkte MAIPA in der Reihenfolge GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V bearbeitet. Der Anteil der fehlenden Werte war daher bei Kindern und Erwachsenen bei den Glykoproteinkomplexen GP Ib/IX und GP V höher als beim zuerst untersuchten Glykoprotein GP IIb/IIIa; Kinder hatten im Vergleich zu den Erwachsenen einen höheren Anteil an fehlenden Werten (siehe Tabelle 9, Tabelle 10). Beim zuletzt untersuchten Glykoproteinkomplex GP V konnte der direkte MAIPA bei mehr als der Hälfte der Kinder (n=1.871, 52,73 %) nicht durchgeführt werden; bei den Erwachsenen bei 4.609 Patienten (30,66 %).

Tabelle 9: Anteil der fehlenden Werte im direkten MAIPA (DM) für die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP

Kinder (n=3548)	Fehlende Werte (n)	Ergebnis im DM (n)
GP IIb/IIIa	828 (23,33 %)	2720 (76,67 %)
GP Ib/IX	1361 (38,36 %)	2187 (61,64 %)
GP V	1871 (52,73 %)	1677 (47,27 %)

Tabelle 10: Anteil der fehlenden Werte im direkten MAIPA (DM) für die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V bei Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP

Erwachsene (n=15031)	Fehlende Werte (n)	Ergebnis im DM (n)
GP IIb/IIIa	1730 (11,51 %)	13301 (88,49 %)
GP Ib/IX	2662 (17,71 %)	12369 (82,29 %)
GP V	4609 (30,66 %)	10422 (69,34 %)

3.2.1 Betrachtung einzelner Glykoproteine

Bei der Analyse der Testergebnisse des direkten MAIPAs wurden zunächst die Glykoproteinkomplexe einzeln betrachtet. Die Ergebnisse der jeweils nicht untersuchten Glykoproteine wurden dabei nicht beachtet.

3.2.1.1 Die Thrombozytenzahl war bei Kindern mit positivem Nachweis thrombozytär gebundener Autoantikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V im direkten MAIPA signifikant niedriger als bei Kindern mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test).

Die Thrombozytenzahl bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP und einem positiven oder negativen Testergebnis im direkten MAIPA ist in Abbildung 15 dargestellt.

Der direkte MAIPA zum Nachweis thrombozytär gebundener Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa wurde bei 2.714 Kindern durchgeführt. Bei 496 (18,28 %) dieser Kinder wurden thrombozytär gebundene Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa nachgewiesen. Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa (Score (+) - 4+) mit 36 G/L (IQR 20-74 G/L) signifikant niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis (74 G/L (IQR 34-132 G/L)) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test).

Das Vorliegen thrombozytär gebundener Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP Ib/IX wurde bei 2.183 Kindern im direkten MAIPA untersucht, 267 (12,23 %) Kinder hatten ein positives Testergebnis. Der Median der Thrombozytenzahl der Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP Ib/IX (Score (+) - 4+) lag mit 52 G/L (IQR 26-95 G/L) signifikant niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis (85 G/L (IQR 47-144 G/L)) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test).

Beim Glykoprotein GP V wurde der direkte MAIPA bei 1.674 Kindern durchgeführt, bei 205 (12,25 %) Kindern waren thrombozytär gebundene Antikörper gegen GP V nachweisbar. Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Patienten mit positivem Testergebnis (Score (+) - 4+) mit 62 G/L (IQR 35,5-104 G/L) signifikant niedriger als

bei Patienten mit negativem Testergebnis (95 G/L (IQR 55-151 G/L)) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test).

Die positiven Testergebnisse des semiquantitativen Scores des direkten MAIPA und der Thrombozytenzahl wurden untersucht. Die Ergebnisse der Glykoproteine GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V sind in Abbildung 15 dargestellt (Kruskal-Wallis Test für alle drei GP: $P < 0,0001$).

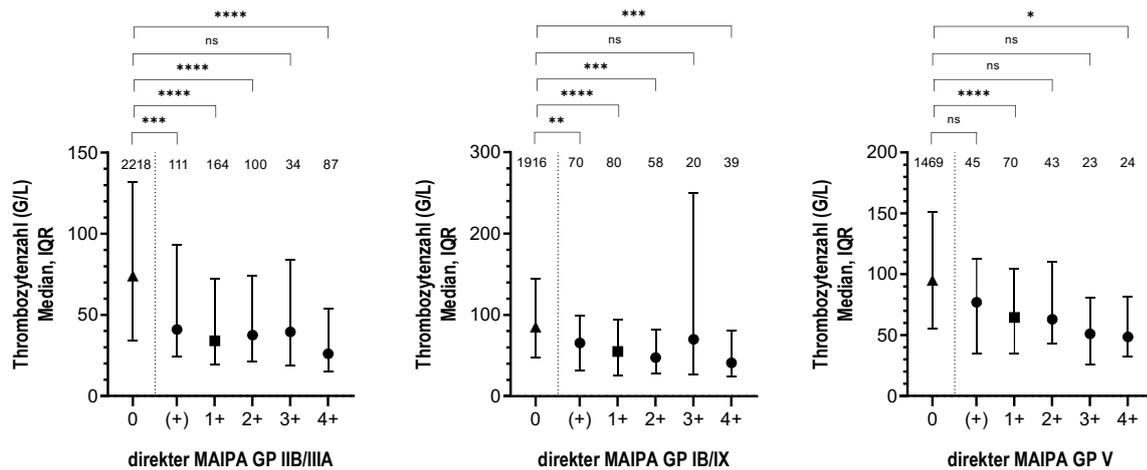


Abbildung 15: Thrombozytenzahl bei Kindern mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA

Thrombozytenzahl bei Kindern mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA (DM) gegen einen der Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V. DM positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen den untersuchten Glykoproteinkomplex nachweisbar (GP IIb/IIIa: $n=496$; GP Ib/IX: $n=267$; GP V: $n=205$). DM negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen den untersuchten Glykoproteinkomplex nicht nachweisbar (GP IIb/IIIa: $n=2218$; GP Ib/IX: $n=1916$; GP V: $n=1469$). Positive Ergebnisse sind nach einem semi-quantitativen Score von (+) bis 4+ eingeteilt. Kruskal-Wallis Test für alle drei GP: $P < 0,0001$. Mann-Whitney Test der Patienten mit negativem (0) oder positivem ((+)-4+) Testergebnis nicht eingezeichnet, für alle drei GP: $P < 0,0001$. Fehlende Werte der Thrombozytenzahl: GP IIb/IIIa=6, GP Ib/IX=4, GP V=3.

Mediane Thrombozytenzahl bei den untersuchten Glykoproteinkomplexen:

Thrombozyten (G/L) DM: Ergebnis	GP IIb/IIIa		GP Ib/IX		GP V	
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR
0	74	34-132	85	47-144	95	55-151
(+)	41	24-93	65,5	31,75-99,75	77	35-113
1+	34	19,25-72,5	55	26-94	64,5	34,75-104
2+	37,5	21,25-74	47,5	28,25-81,5	63	43-110
3+	39,5	19-84	70	26,5-250,3	51	26-81
4+	26	15-54	41	24-81	48,5	32,25-82
Positiv (+)-4+	36	20-74	52	26-95	62	35,5-104

3.2.1.2 Bei Kindern mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V zeigte der semiquantitative Score eine Assoziation mit der Thrombozytenzahl; bei dem Glykoproteinkomplex GP V war diese signifikant (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16).

Bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V lag der Median der Thrombozytenzahl bei Patienten mit dem höchsten Score (4+) am niedrigsten (GP IIb/IIIa=26 G/L (IQR 15-54 G/L), GP Ib/IX=41 G/L (IQR 24-81 G/L), GP V=48,5 G/L (IQR 32,25-82 G/L)). Den höchsten Median der Thrombozytenzahl hatten Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V (GP IIb/IIIa=74 G/L (IQR 34-132 G/L), GP Ib/IX=85 G/L (IQR 47-144 G/L), GP V=95 G/L (IQR 55-151 G/L)).

Die Assoziation des semiquantitativen Scores mit den Medianen der Thrombozytenzahl ergab in der linearen Regressionsanalyse folgende R^2 -Werte (Spearman's rho r): GP IIb/IIIa: $R^2=0,605$ ($r=-0,77$); GP Ib/IX: $R^2=0,5053$ ($r=-0,66$); GP V: $R^2=0,9252$ ($r=-1,00$) (siehe Abbildung 16). Bei dem Glykoproteinkomplex GP V war diese signifikant (GP V: $P = 0,0014$, Spearman-Korrelationsanalyse). Sobald thrombozytär gebundene Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V im direkten MAIPA nachgewiesen wurden, fiel die Thrombozytenzahl im Vergleich zu den Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V ab; schon bei einem positiven Testergebnis von (+) zeigte sich dieser Effekt (Kruskal-Wallis Test negativ vs. (+): GP IIb/IIIa: $P = 0,0007$, GP Ib/IX: $P = 0,0032$, GP V: $P = ns$) (siehe Abbildung 15).

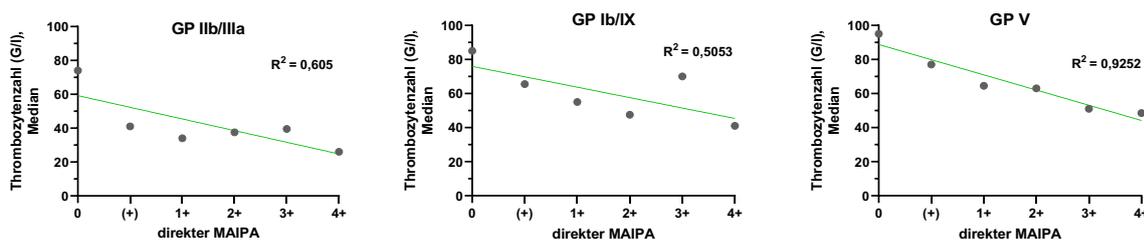


Abbildung 16: Geraden der linearen Regressionsanalyse der Ergebnisse des semiquantitativen Scores des direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V) und der Mediane der Thrombozytenzahl bei Kindern mit Verdachtsdiagnose ITP

Die lineare Regressionsanalyse bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP und positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA und der Mediane der Thrombozytenzahl wurde für die Glykoproteine GP IIb/IIIa (links), GP Ib/IX (Mitte) und GP V (rechts) durchgeführt und ergab folgende Werte des Bestimmtheitsmaß: GP IIb/IIIa: $R^2=0,605$, GP Ib/IX: $R^2=0,5053$, GP V: $R^2=0,9252$.

3.2.1.3 Die Thrombozytenzahl war bei Erwachsenen mit positivem Nachweis thrombozytär gebundener Autoantikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V im direkten MAIPA signifikant niedriger als bei Erwachsenen mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test).

Die Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP und einem positiven oder negativen Testergebnis im direkten MAIPA ist in Abbildung 17 dargestellt.

Der direkte MAIPA zum Nachweis thrombozytär gebundener Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa wurde bei 13.276 Erwachsenen durchgeführt. Bei 1.382 (10,41 %) dieser wurden thrombozytär gebundene Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa nachgewiesen. Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa (Score (+) - 4+) mit 43 G/L (IQR 18-80 G/L) signifikant niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis (81 G/L (IQR 46-120 G/L) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test).

Das Vorliegen thrombozytär gebundener Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP Ib/IX wurde bei 12.346 Erwachsenen im direkten MAIPA untersucht, 1.021 (8,27 %) Erwachsene hatten ein positives Testergebnis. Der Median der Thrombozytenzahl der Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP Ib/IX (Score (+) - 4+) lag mit 51 G/L (IQR 27,5-85 G/L) signifikant niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis (84 G/L (IQR 51-122 G/L)) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test).

Beim Glykoprotein GP V wurde der direkte MAIPA bei 10.402 Erwachsenen durchgeführt, bei 688 (6,61 %) Erwachsenen waren thrombozytär gebundene Antikörper gegen GP V nachweisbar. Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Patienten mit positivem Testergebnis (Score (+) - 4+) mit 61 G/L (IQR 35-96,75 G/L) signifikant niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis (86 G/L (IQR 54-122 G/L)) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test).

Die positiven Testergebnisse des semiquantitativen Scores des direkten MAIPA und der Thrombozytenzahl wurden untersucht. Die Ergebnisse der Glykoproteine GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V sind in Abbildung 17 dargestellt (Kruskal-Wallis Test für alle drei GP: $P < 0,0001$).

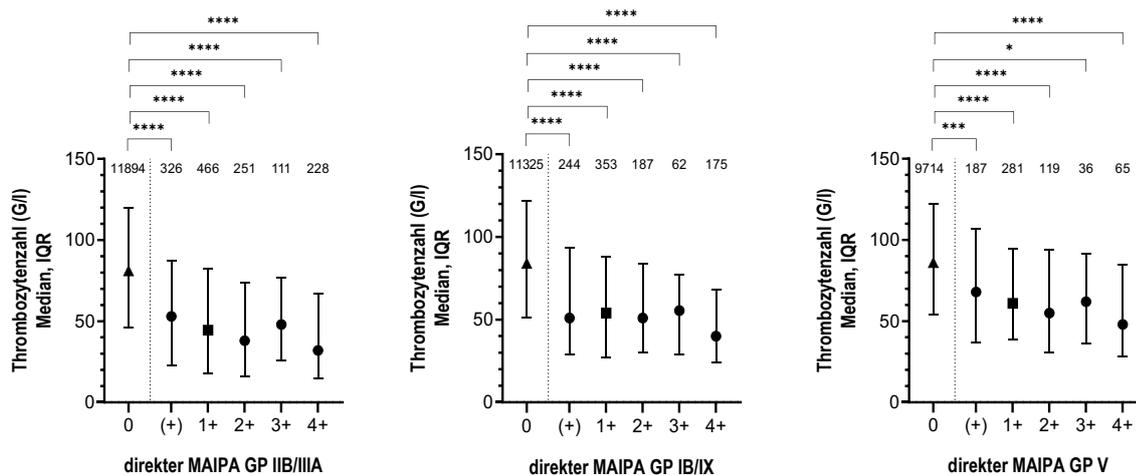


Abbildung 17: Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA

Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA (DM) gegen einen der Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V. DM positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen den untersuchten Glykoproteinkomplex nachweisbar (GP IIb/IIIa: n=1382; GP Ib/IX: n=1021; GP V: n=688). DM negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen den untersuchten Glykoproteinkomplex nicht nachweisbar (GP IIb/IIIa: n=11894; GP Ib/IX: n=11325; GP V: n=9714). Positive Ergebnisse sind nach einem semi-quantitativen Score von (+) bis 4+ eingeteilt. Kruskal-Wallis Test für alle drei GP: P<0.0001. Mann-Whitney Test der Patienten mit negativem (0) oder positivem ((+)-4+) Testergebnis nicht eingezeichnet, für alle drei GP: P<0.0001. Fehlende Werte der Thrombozytenzahl: GP IIb/IIIa=25, GP Ib/IX=23, GP V=19. Mediane Thrombozytenzahl bei den untersuchten Glykoproteinkomplexen:

Thrombozyten (G/L) DM: Ergebnis	GP IIb/IIIa		GP Ib/IX		GP V	
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR
0	81	46-120	84	51-122	86	54-122
(+)	53	27-81	51	29-93,5	68	37-107
1+	44,5	18-82,25	54	27-88	61	38,5-94,5
2+	38	16-74	51	30-84	55	31-94
3+	48	26-77	55,5	28,75-77	62	36,25-91,75
4+	32	15-76	40	24-68	48	28-85
Positiv (+)-4+	43	18-80	51	27,5-85	61	35-96,75

3.2.1.4 Bei Erwachsenen mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V zeigte der semiquantitative Score eine Assoziation mit der Thrombozytenzahl; bei den Glykoproteinkomplexen GP IIb/IIIa und GP V war diese signifikant (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18).

Bei Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V lag der Median der Thrombozytenzahl bei Patienten mit dem höchsten Score (4+) am niedrigsten (GP IIb/IIIa=32 G/L (IQR 15-76 G/L), GP Ib/IX=40 G/L (IQR 24-68 G/L), GP V=48 G/L (IQR 28-85 G/L)). Den höchsten Median der Thrombozytenzahl hatten Patienten mit negativem Testergebnis

im direkten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V (GP IIb/IIIa=81 G/L (IQR 46-120 G/L), GP Ib/IX=84 G/L (IQR 51-122 G/L), GP V=86 G/L (IQR 54-122 G/L)).

Die Assoziation des semiquantitativen Scores mit den Medianen der Thrombozytenzahl ergab in der linearen Regressionsanalyse folgende R^2 -Werte (Spearman's rho r): GP IIb/IIIa: $R^2=0,6901$ ($r=-0,83$); GP Ib/IX: $R^2=0,573$ ($r=-0,55$); GP V: $R^2=0,7721$ ($r=-0,83$) (siehe Abbildung 18). Bei den Glykoproteinkomplexen GP IIb/IIIa und GP V war diese signifikant (GP IIb/IIIa und GP V: $P = 0,03$, Spearman-Korrelationsanalyse). Die Thrombozytenzahl bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V war niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V; schon bei einem positiven Testergebnis von (+) zeigte sich dieser Effekt (Kruskal-Wallis Test negativ vs. (+): GP IIb/IIIa: $P < 0,0001$, GP Ib/IX: $P < 0,0001$, GP V: $P = 0,0004$) (siehe Abbildung 17).

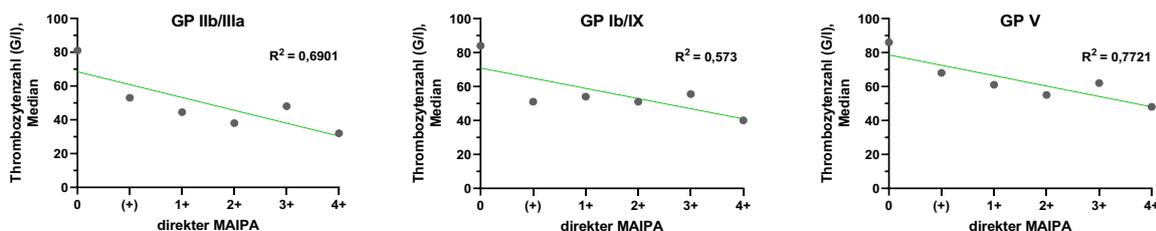


Abbildung 18: Geraden der linearen Regressionsanalyse der Ergebnisse des semiquantitativen Scores des direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V) und der Medianen der Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP

Die lineare Regressionsanalyse bei Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP und positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA und der Medianen der Thrombozytenzahl wurde für die Glykoproteine GP IIb/IIIa (links), GP Ib/IX (Mitte) und GP V (rechts) durchgeführt und ergab folgende Werte des Bestimmtheitsmaß: GP IIb/IIIa: $R^2=0,6901$, GP Ib/IX: $R^2=0,573$, GP V: $R^2=0,7721$.

Kinder und Erwachsene mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V hatten signifikant niedrigere Thrombozytenzahlen als Patienten mit negativem Testergebnis, bei denen keine thrombozytären Antikörper gegen die drei Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V nachgewiesen wurden ($P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test); dieser Unterschied wurde unabhängig vom Score beobachtet (siehe Abbildung 19).

Bei Kindern und Erwachsenen mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V stiegen die Mediane der Thrombozytenzahl in der Reihenfolge der untersuchten Glykoproteinkomplexe an (GP IIb/IIIa < GP Ib/IX < GP V).

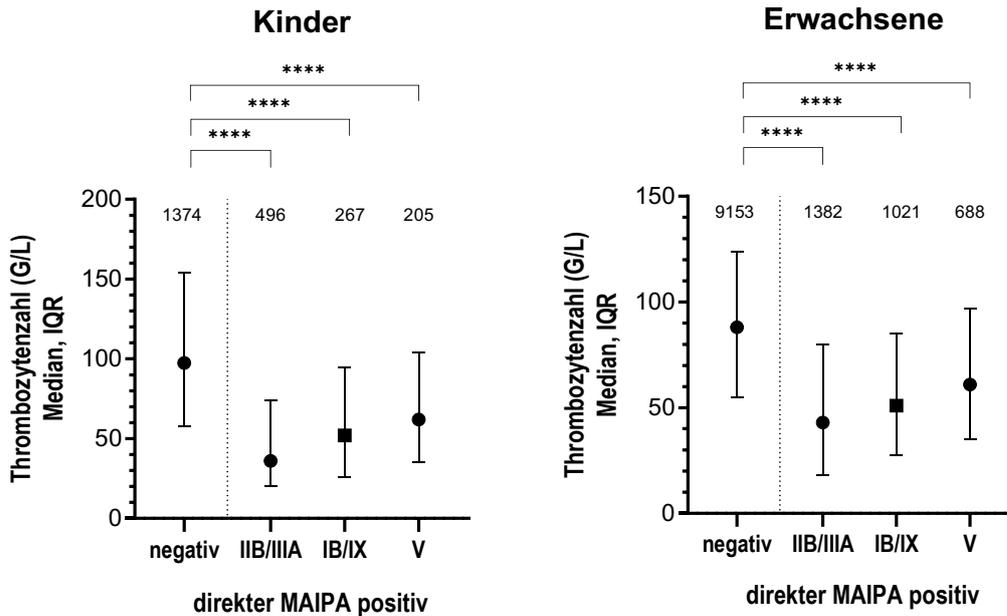


Abbildung 19: Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA

Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA (DM) gegen einen der Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V. DM positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen den untersuchten Glykoproteinkomplex nachweisbar (Kinder: GP IIb/IIIa: n=496; GP Ib/IX: n=267; GP V: n=205; Erwachsene: GP IIb/IIIa: n=1382; GP Ib/IX: n=1021; GP V: n=688). DM negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V nicht nachweisbar (Kinder: n=1374, Erwachsene: n=9153). Kruskal-Wallis Test für Kinder und Erwachsene: P<0.0001. Fehlende Werte der Thrombozytenzahl: Kinder=3, Erwachsene=24. Mediane Thrombozytenzahl bei den untersuchten Glykoproteinkomplexen:

	Kinder				Erwachsene			
	negativ	GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	GP V	negativ	GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	GP V
Median	97,5	36	52	62	88	43	51	61
IQR	58-154	20-74	26-95	35,5-104	55-124	18-80	27,5-85	35-96,75

3.2.2 Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität und Spezifität des direkten MAIPA wurde bei Kindern und Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP anhand der in Tabelle 11 dargestellten Werte ermittelt. Die Berechnung wurde für jedes Glykoprotein (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V) einzeln durchgeführt. Als Diskriminierungswert wurde eine Thrombozytenzahl von < 100 G/L oder \geq 100 G/L gewählt, da ein Wert < 100 G/L Thrombozyten in der Literatur als Diagnosekriterium der ITP genannt wird [59].

Tabelle 11: Positive und negative Testergebnisse im direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V) und Thrombozytenzahl (TZ) bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP

Kinder			
GP IIb/IIIa	TZ < 100 G/L	TZ ≥ 100 G/L	Gesamt
Positiv	418	78	496
Negativ	1393	825	2218
Gesamt	1811	903	2714

Erwachsene			
GP IIb/IIIa	TZ < 100 G/L	TZ ≥ 100 G/L	Gesamt
Positiv	1167	215	1382
Negativ	7478	4416	11894
Gesamt	8645	4631	13276

GP Ib/IX	TZ < 100 G/L	TZ ≥ 100 G/L	Gesamt
Positiv	207	60	267
Negativ	1098	818	1916
Gesamt	1305	878	2183

GP Ib/IX	TZ < 100 G/L	TZ ≥ 100 G/L	Gesamt
Positiv	837	184	1021
Negativ	6912	4413	11325
Gesamt	7749	4597	12346

GP V	TZ < 100 G/L	TZ ≥ 100 G/L	Gesamt
Positiv	151	54	205
Negativ	773	696	1469
Gesamt	924	750	1674

GP V	TZ < 100 G/L	TZ ≥ 100 G/L	Gesamt
Positiv	527	161	688
Negativ	5859	3855	9714
Gesamt	6386	4016	10402

Bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP und positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA konnte für das Glykoprotein GP IIb/IIIa eine Sensitivität von 23,08 % und eine Spezifität von 91,36 % berechnet werden. Der positive prädiktive Wert betrug 84,27 %. Die Sensitivität bei Kindern mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA GP Ib/IX betrug 15,86 %, die Spezifität 93,17 % und der positive prädiktive Wert 77,53 %. Für das Glykoprotein GP V wurden folgende Werte errechnet: Sensitivität 16,34 %, Spezifität 92,80 % und positiver prädiktiver Wert 73,66 %.

Bei Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP und positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa zeigte sich eine Sensitivität von 13,50 %, und eine Spezifität von 95,36 %; der positive prädiktive Wert lag bei 84,44 %. Die Sensitivität bei Erwachsenen mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA GP Ib/IX betrug 10,80 %, die Spezifität 96,00 % und der positive prädiktive Wert 81,98 %. Für das Glykoprotein GP V wurden folgende Werte errechnet: Sensitivität 8,25 %, Spezifität 95,99 % und positiver prädiktiver Wert 76,60 %.

Die Ergebnisse der Sensitivität, der Spezifität, des positiven und negativen prädiktiven Wertes sind in Tabelle 12 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 12: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und Ergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V

Kinder				Erwachsene			
	GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	GP V		GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	GP V
Sensitivität	23,08 %	15,86 %	16,34 %	Sensitivität	13,50 %	10,80 %	8,25 %
Spezifität	91,36 %	93,17 %	92,80 %	Spezifität	95,36 %	96,00 %	95,99 %
Positiver prädiktiver Wert	84,27 %	77,53 %	73,66 %	Positiver prädiktiver Wert	84,44 %	81,98 %	76,60 %
Negativer prädiktiver Wert	37,20 %	42,69 %	47,38 %	Negativer prädiktiver Wert	37,13 %	38,97 %	39,68 %

3.2.3 Kombination mehrerer Glykoproteine

Anschließend wurde untersucht, wie sich das gleichzeitige Vorliegen mehrerer Antikörperspezifitäten auf die Thrombozytenzahl auswirkt. Sowohl die Kombination von Antikörpern gegen die beiden im direkten MAIPA untersuchten Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX, als auch die Kombination von Antikörpern gegen alle drei im direkten MAIPA untersuchten Glykoproteinkomplexe (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V) wurde betrachtet. Zunächst wurden die Patienten stratifiziert, die ein positives oder negatives Testergebnis im direkten MAIPA für die jeweils untersuchte Kombination von Glykoproteinkomplexen (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V) hatten (siehe Tabelle 9, Tabelle 10).

Zur Analyse der Testergebnisse der beiden Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX im direkten MAIPA wurden je nach positivem/negativem Ergebnis die in Abbildung 20 dargestellten vier Gruppen gebildet.

Die Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA für die Glykoproteine GP IIb/IIIa und GP Ib/IX ist in Abbildung 20 dargestellt.

3.2.3.1 Die Thrombozytenzahl war bei Kindern mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX nicht signifikant niedriger als bei Kindern mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX (GP IIb/IIIa: $P > 0,05$; GP Ib/IX: $P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test); ein additiver Effekt der beiden Antikörperspezifitäten GP IIb/IIIa und GP Ib/IX zeigte sich nicht.

Bei 2.181 Kindern wurde der direkte MAIPA für beide Glykoproteinkomplexe (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX) durchgeführt. 221 (10,13 %) Kinder hatten im direkten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX ein positives Testergebnis. Bei 116 (5,32 %) Kindern wurden im direkten MAIPA thrombozytäre Antikörper nur gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa nachgewiesen, bei 46 (2,11 %) nur gegen GP Ib/IX.

Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX mit 48 G/L (IQR 26-93 G/L) signifikant niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX (87 G/L (IQR 48-146 G/L)) ($P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test). Der Median der Thrombozytenzahl bei Patienten mit nur einer nachgewiesenen Antikörperspezifität im direkten MAIPA (GP IIb/IIIa: 63,5 G/L (IQR 32,25-100,5 G/L); GP Ib/IX: 68 G/L (IQR 31-108,8 G/L)) war nicht signifikant unterschiedlich zu den Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX (48 G/L (IQR 26-93 G/L)) (GP IIb/IIIa: $P > 0,05$; GP Ib/IX: $P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Auch der Unterschied der Thrombozytenzahl der Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa und Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP Ib/IX war nicht signifikant ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test).

Die Thrombozytenzahl war bei Kindern ohne nachgewiesene Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX im direkten MAIPA am höchsten (87 G/L (IQR 48-146 G/L)); bei Patienten mit positivem Nachweis beider Antikörperspezifitäten am niedrigsten (48 G/L (IQR 26-93 G/L)). Die Thrombozytenzahl der Patienten, die nur eine Antikörperspezifität aufwiesen, lag dazwischen (GP IIb/IIIa: 63,5 G/L (IQR 32,25-100,5 G/L); GP Ib/IX: 68 G/L (IQR 31-108,8 G/L)).

3.2.3.2 Bei den Erwachsenen war die Thrombozytenzahl bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX signifikant niedriger als bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX (GP IIb/IIIa: $P = 0,0009$; GP Ib/IX: $P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test); es bestand ein additiver Effekt der beiden Antikörperspezifitäten GP IIb/IIIa und GP Ib/IX auf die Thrombozytenzahlerniedrigung.

Bei 12.335 Erwachsenen wurde der direkte MAIPA für die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX durchgeführt. Einen positiven Nachweis von thrombozytär gebundenen Antikörpern gegen die beiden Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX hatten 686 (5,56 %) Erwachsene. Thrombozytär gebundene Antikörper gegen einen der beiden Glykoproteinkomplexe wurden bei 449 (GP IIb/IIIa; 3,64 %) bzw. 334 (GP Ib/IX; 2,71 %) Erwachsenen nachgewiesen.

Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX hatten einen signifikant niedrigeren Median der Thrombozytenzahl (47 G/L (IQR 26-81 G/L)) als Patienten mit nicht nachgewiesenen Antikörpern gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa (62 G/L (IQR 32-99 G/L)) oder GP Ib/IX (58 G/L (IQR 32-99,25 G/L)) (GP IIb/IIIa: $P = 0,0009$; GP Ib/IX: $P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test) oder mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX (85 G/L (IQR 52-123 G/L)) ($P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test). Der Unterschied der Thrombozytenzahl der Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa und Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP Ib/IX war nicht signifikant ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test).

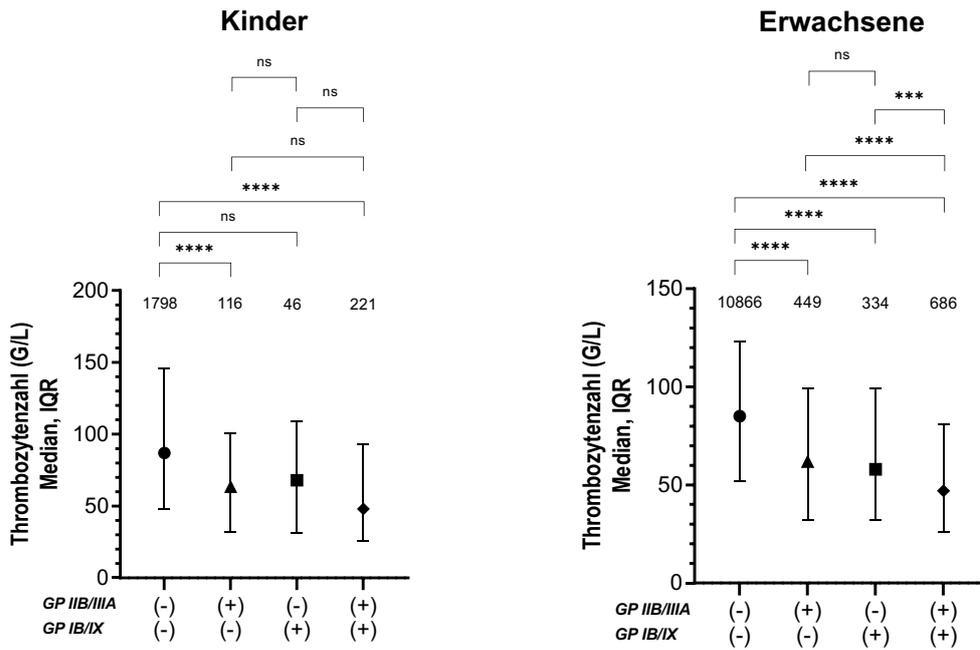


Abbildung 20: Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA für die Glykoproteine GP IIb/IIIa und GP Ib/IX

Thrombozytenzahl bei Kindern (n=2185) und Erwachsenen (n=12357) mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA (DM) gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX. DM positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen die untersuchten Glykoproteinkomplexe nachweisbar. DM negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen die untersuchten Glykoproteinkomplexe nicht nachweisbar. Kruskal-Wallis Test Kinder und Erwachsene: P<0.0001. Gruppengrößen und Mediane der Thrombozytenzahl bei den untersuchten Glykoproteinkomplexen:

Kinder:

GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	n (2185)	Median	IQR	Fehlende Werte (n)
-	-	1802	87	48-146	4
+	-	116	63,5	32,25-100,5	0
-	+	46	68	31-108,8	0
+	+	221	48	26-93	0

Erwachsene:

GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	n (12357)	Median	IQR	Fehlende Werte (n)
-	-	10887	85	52-123	21
+	-	449	62	32-99	0
-	+	334	58	32-99,25	0
+	+	687	47	26-81	1

Zur Analyse der Assoziation der simultanen Glykoproteinbeladung aller drei im direkten MAIPA untersuchten Glykoproteinkomplexe (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V) mit der Thrombozytenzahl wurden die in Abbildung 21 dargestellten Gruppen gebildet.

3.2.3.3 Die Thrombozytenzahl war bei Kindern und Erwachsenen mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V nicht signifikant niedriger als bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test); ein additiver Effekt auf die Thrombozytenzahlerniedrigung durch das Vorliegen einer weiteren Antikörperspezifität gegen den Glykoproteinkomplex GP V zeigte sich nicht.

Der direkte MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V wurde bei 1.671 Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP durchgeführt. Bei 14 (0,84 %) Patienten wurden im direkten MAIPA thrombozytäre Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX nachgewiesen, bei 137 (8,20 %) Patienten thrombozytäre Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V. Der Median der Thrombozytenzahl der Patienten mit zwei nachgewiesenen Antikörperspezifitäten im direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX) lag bei 45,5 G/L (IQR 34-76 G/L) und unterschied sich nicht signifikant von den Patienten mit drei nachgewiesenen Antikörperspezifitäten (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V) (56 G/L (IQR 34-103 G/L)) ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test).

Bei 10.394 Erwachsenen wurde der direkte MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V mit der Verdachtsdiagnose ITP durchgeführt. Bei 95 (0,91 %) Patienten wurden im direkten MAIPA thrombozytäre Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX nachgewiesen, bei 409 (3,93 %) Patienten thrombozytäre Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V. Der Median der Thrombozytenzahl der Patienten mit zwei nachgewiesenen Antikörperspezifitäten im direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX) lag bei 50 G/L (IQR 29-75 G/L) und unterschied sich nicht signifikant von den Patienten mit drei nachgewiesenen Antikörperspezifitäten (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V) (55 G/L (IQR 32-89 G/L)) ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test).

Die Patienten mit nachgewiesenen Antikörpern gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX und nicht nachgewiesenen Antikörpern gegen den Glykoproteinkomplex GP V hatten die niedrigste Thrombozytenzahl der untersuchten Gruppen (Kinder: Median=45,5 G/L (IQR 34-76 G/L); Erwachsene: Median=50 G/L (IQR 29-75 G/L)) (siehe Abbildung 21).

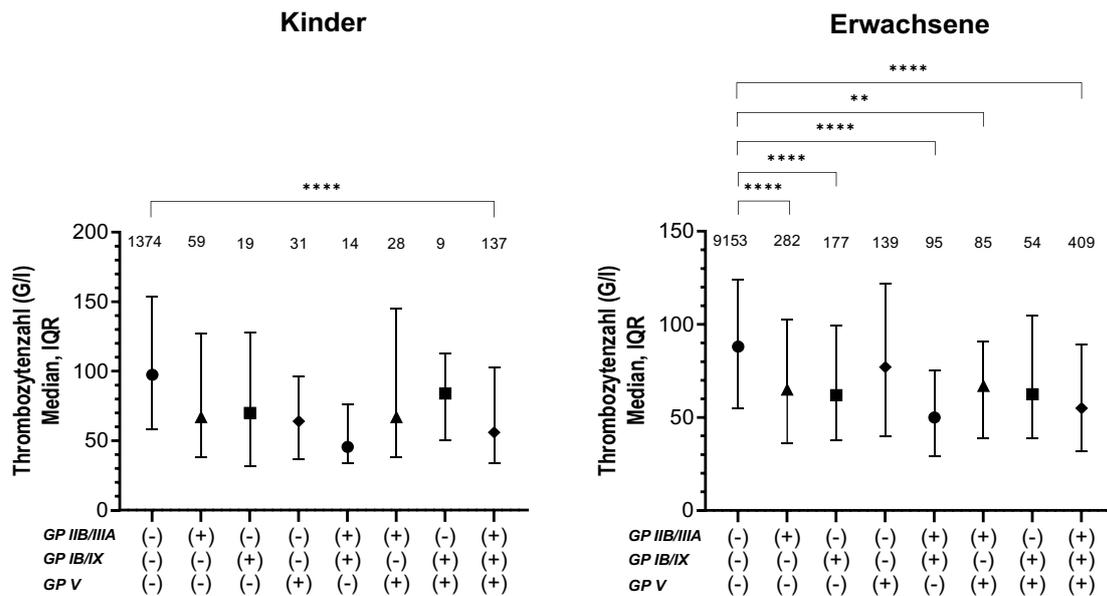


Abbildung 21: Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA für die Glykoproteine GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V

Thrombozytenzahl bei Kindern (n=1674) und Erwachsenen (n=10414) mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA (DM) gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V. DM positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen die untersuchten Glykoproteinkomplexe nachweisbar. DM negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen die untersuchten Glykoproteinkomplexe nicht nachweisbar. Kruskal-Wallis Test Kinder und Erwachsene: P<0.0001. Nicht eingezeichnete Analysen zwischen den einzelnen Gruppen: nicht signifikant. Gruppengrößen und Mediane der Thrombozytenzahl bei den untersuchten Glykoproteinkomplexen:

Kinder:

GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	GP V	n (1674)	Median	IQR	Fehlende Werte (n)
-	-	-	1377	97,5	58-154	3
+	-	-	59	67	38-127	0
-	+	-	19	70	32-128	0
-	-	+	31	64	37-96	0
+	+	-	14	45,5	34-76	0
+	-	+	28	67	38,25-145	0
-	+	+	9	84	50,5-113	0
+	+	+	137	56	34-103	0

Erwachsene:

GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	GP V	n (10414)	Median	IQR	Fehlende Werte (n)
-	-	-	9127	88	55-124	19
+	-	-	282	65	36-102,5	0
-	+	-	177	62	38-99,5	0
-	-	+	139	77	40-122	0
+	+	-	95	50	29-75	0
+	-	+	85	67	39-90,5	0
-	+	+	54	62,5	38,75-104,8	0
+	+	+	410	55	32-89	1

3.3 Indirekter MAIPA

Da der indirekte MAIPA im Gegensatz zum direkten MAIPA keine bestimmte Anzahl an Patiententhrombozyten pro Ansatz benötigt, war bei den meisten Patienten die Untersuchung auf freie thrombozytäre Antikörper gegen alle drei Glykoproteinkomplexe (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa) möglich. Der Anteil der fehlenden Werte lag bei den Kindern für alle drei Glykoproteinkomplexe bei ca. 67 %, bei den Erwachsenen bei ca. 71 % (siehe Tabelle 13, Tabelle 14). Der höhere Anteil an fehlenden Werten im Vergleich zum direkten MAIPA kommt dadurch zustande, dass der indirekte MAIPA laut Laborprotokoll nicht bei Patienten durchgeführt wurde, deren Testergebnis im PIFT negativ oder einfach positiv (1+) war.

Tabelle 13: Anteil der fehlenden Werte im indirekten MAIPA (IM) für die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP

Kinder (n=3548)	Fehlende Werte (n)	Ergebnis im IM (n)
GP IIb/IIIa	2381 (67,11 %)	1167 (32,89 %)
GP Ib/IX	2393 (67,45 %)	1155 (32,55 %)
GP Ia/IIa	2387 (67,28 %)	1161 (32,72 %)

Tabelle 14: Anteil der fehlenden Werte im indirekten MAIPA (IM) für die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa bei Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP

Erwachsene (n=15031)	Fehlende Werte (n)	Ergebnis im IM (n)
GP IIb/IIIa	10785 (71,75 %)	4246 (28,25 %)
GP Ib/IX	10811 (71,92 %)	4220 (28,08 %)
GP Ia/IIa	10798 (71,84 %)	4233 (28,16 %)

3.3.1 Betrachtung einzelner Glykoproteine

Zunächst wurde die Assoziation von freien thrombozytären Antikörpern gegen einen der Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/IIa im indirekten MAIPA und der Thrombozytenzahl untersucht. Die Ergebnisse der jeweils nicht untersuchten Glykoproteinkomplexe wurden dabei nicht beachtet.

3.3.1.1 Die Thrombozytenzahl war bei Kindern mit positivem Nachweis freier thrombozytärer Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX im indirekten MAIPA signifikant niedriger als bei Kindern mit negativem Testergebnis im indirekten MAIPA (GP IIb/IIIa: $P = 0,0037$, GP Ib/IX: $P = 0,0017$, Mann-Whitney Test); bei Kindern mit positivem Nachweis freier thrombozytärer Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP Ia/IIa und Kindern mit negativem Testergebnis im indirekten MAIPA GP Ia/IIa war der Unterschied nicht signifikant ($P > 0,05$, Mann-Whitney Test).

In Abbildung 22 ist die Thrombozytenzahl bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP und einem positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA dargestellt.

Der indirekte MAIPA GP IIb/IIIa wurde bei 1.018 Kindern durchgeführt. Bei 332 (32,61 %) Kindern wurden freie thrombozytäre Antikörper nachgewiesen. Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Patienten mit positivem Testergebnis (Score (+)-4+) mit 22 G/L (IQR 9-59,5 G/L) signifikant niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis (29,5 G/L (IQR 12-76 G/L)) ($P = 0,0037$, Mann-Whitney Test).

Beim Glykoproteinkomplex GP Ib/IX wurde der indirekte MAIPA bei 1.008 Kinder durchgeführt, bei 283 (28,08 %) Kindern waren freie Antikörper nachweisbar. Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Patienten mit positivem Testergebnis (Score (+)-4+) mit 21 G/L (IQR 8-57 G/L) signifikant niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis (30 G/L (IQR 12-76 G/L)) ($P = 0,0017$, Mann-Whitney Test).

Für den Glykoproteinkomplex GP Ia/IIa wurde der indirekte MAIPA bei 1.013 Kindern durchgeführt, 158 (15,60 %) Kinder hatten ein positives Testergebnis. Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Patienten mit positivem Testergebnis (Score (+)-4+) nicht signifikant niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis ($P > 0,05$, Mann-Whitney Test).

Die positiven Testergebnisse des semiquantitativen Scores des indirekten MAIPA und der Thrombozytenzahl wurden untersucht. Die Ergebnisse der Glykoproteine GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa sind in Abbildung 22 dargestellt (Kruskal-Wallis Test GP IIb/IIIa: $P = 0,0112$, GP Ib/IX: $P = 0,0029$, GP Ia/IIa: $P = 0,4071$).

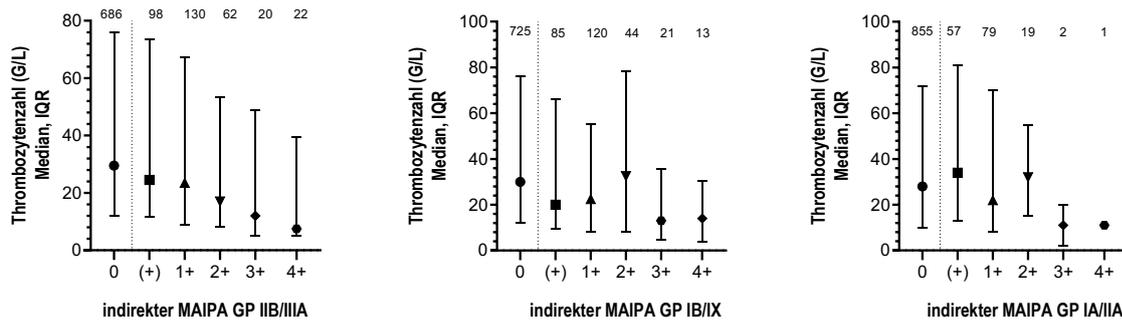


Abbildung 22: Thrombozytenzahl bei Kindern mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA

Thrombozytenzahl bei Kindern mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA (IM) gegen einen der Glykoproteinkomplexe GP IIB/IIIA, GP IB/IX oder GP IA/IIA. IM positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen den untersuchten Glykoproteinkomplex nachweisbar (GP IIB/IIIA: n=332; GP IB/IX: n=283; GP IA/IIA: n=158). IM negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen den untersuchten Glykoproteinkomplex nicht nachweisbar (GP IIB/IIIA: n=686; GP IB/IX: n=725; GP IA/IIA: n=855). Positive Ergebnisse sind nach einem semi-quantitativen Score von (+) bis 4+ eingeteilt. Kruskal-Wallis Test: GP IIB/IIIA P=0,0112; GP IB/IX P=0,0029; GP IA/IIA P=0,4071. Nicht eingezeichnete Analysen zwischen den einzelnen Gruppen: nicht signifikant. Mann-Whitney Test der Patienten mit negativem (0) oder positivem ((+)-4+) Testergebnis nicht eingezeichnet: GP IIB/IIIA: P=0.0112, GP IB/IX: P=0.0029, GP IA/IIA: P=0.4071). Fehlende Werte der Thrombozytenzahl: GP IIB/IIIA=149, GP IB/IX=147, GP IA/IIA=148.

Mediane Thrombozytenzahl bei den untersuchten Glykoproteinkomplexen:

Thrombozyten (G/L) IM: Ergebnis	GP IIB/IIIA		GP IB/IX		GP IA/IIA	
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR
0	29,5	12-76	30	12-76	28	10-72
(+)	24,5	11,75-73,5	20	9,5-66	34	13-81
1+	23,5	9-67,25	22,5	8,25-55	22	8-70
2+	17	8-53,25	32,5	8,25-78,25	32	15-55
3+	12	5,25-49	13	4,5-35,5	11	2-20
4+	7,5	5-39,5	14	4-30,5	11	11-11
Positiv ((+)-4+)	22	9-59,5	21	8-57	24	10-70

3.3.1.2 Bei Kindern mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIB/IIIA zeigte der semiquantitative Score eine Assoziation mit der Thrombozytenzahl; diese war signifikant. Beim Glykoproteinkomplex GP IB/IX zeigte sich diese nicht (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23).

Bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIB/IIIA lag der Median der Thrombozytenzahl bei Patienten mit dem höchsten Score (4+) am niedrigsten (GP IIB/IIIA=7,5 G/L (IQR 5-39,5 G/L)). Den höchsten Median der Thrombozytenzahl hatten Patienten mit negativem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIB/IIIA (29,5 G/L (IQR 12-76 G/L)).

Bei Kindern mit im indirekten MAIPA nachgewiesenen, freien, thrombozytären Antikörpern gegen den Glykoproteinkomplex GP IIB/IIIA, fiel die Thrombozytenzahl, nach dem semiquantitativen Score stratifiziert, im Vergleich zu den Patienten mit negativem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIB/IIIA, ab. Bei Kindern mit positivem

Testergebnis im indirekten MAIPA GP Ib/IX zeigte sich die Assoziation des semiquantitativen Scores mit der Thrombozytenzahl nicht. Für den Glykoproteinkomplex GP Ia/IIa wurde diese Analyse nicht durchgeführt, da die Untersuchung in 3.3.1.1 nicht signifikant war.

Die Assoziation des semiquantitativen Scores mit den Medianen der Thrombozytenzahl ergab in der linearen Regressionsanalyse folgende R^2 -Werte (Spearman's rho r): GP IIb/IIIa: $R^2=0,9792$ ($r=-0,99$); GP Ib/IX: $R^2=0,3657$ ($r=-0,54$) (siehe Abbildung 23). Bei dem Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa war diese signifikant (GP IIb/IIIa: $P = 0,0028$, Spearman-Korrelationsanalyse).

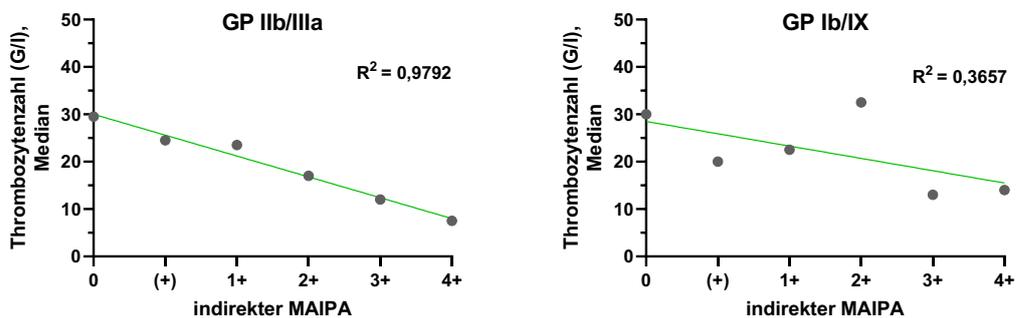


Abbildung 23: Geraden der linearen Regressionsanalyse der Ergebnisse des semiquantitativen Scores des indirekten MAIPA (GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX) und der Mediane der Thrombozytenzahl bei Kindern mit Verdachtsdiagnose ITP

Die lineare Regressionsanalyse bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP und positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA und der Mediane der Thrombozytenzahl wurde für die Glykoproteine GP IIb/IIIa (links) und GP Ib/IX (rechts) durchgeführt und ergab folgende Werte des Bestimmtheitsmaß: GP IIb/IIIa: $R^2=0,9792$, GP Ib/IX: $R^2=0,3657$.

3.3.1.3 Die Thrombozytenzahl war bei Erwachsenen mit positivem Nachweis freier thrombozytärer Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/IIa im indirekten MAIPA signifikant niedriger als bei Erwachsenen mit negativem Testergebnis im indirekten MAIPA (GP IIb/IIIa: $P < 0,0001$, GP Ib/IX: $P < 0,0001$, GP Ia/IIa: $P = 0,0046$, Mann-Whitney Test).

In Abbildung 24 ist die Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP und einem positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA dargestellt.

Bei 3.711 Erwachsenen wurde der indirekte MAIPA für das Glykoprotein GP IIb/IIIa durchgeführt, bei 1.104 (29,75 %) Erwachsenen waren freie Antikörper im Serum nachweisbar. Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Patienten mit positivem Testergebnis (Score (+)-4+) mit 42 G/L (IQR 11-91 G/L) signifikant niedriger als bei

Patienten mit negativem Testergebnis (62 G/L (IQR 19-107 G/L)) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test).

Das Vorliegen freier thrombozytärer Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP Ib/IX wurde bei 3.691 Erwachsenen im indirekten MAIPA untersucht, 836 (22,65 %) Erwachsene hatten ein positives Testergebnis. Der Median der Thrombozytenzahl der Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP Ib/IX (Score (+)-4+) lag mit 40 G/L (IQR 11-91 G/L) signifikant niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis (61 G/L (IQR 19-106)) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test).

Der indirekte MAIPA GP Ia/IIa wurde bei 3.702 Erwachsenen durchgeführt. 500 (13,51 %) Erwachsene hatten ein positives Testergebnis. Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP Ia/IIa (Score (+)-4+) mit 47,5 G/L (IQR 13-95,75 G/L) signifikant niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis (58 G/L (IQR 17-104 G/L)) ($P = 0,0046$, Mann-Whitney Test).

Die positiven Testergebnisse des semiquantitativen Scores des indirekten MAIPA und der Thrombozytenzahl wurden untersucht. Die Ergebnisse der Glykoproteine GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa sind in Abbildung 24 dargestellt (Kruskal-Wallis Test GP IIb/IIIa: $P < 0,0001$, GP Ib/IX: $P < 0,0001$, GP Ia/IIa: $P = 0,158$).

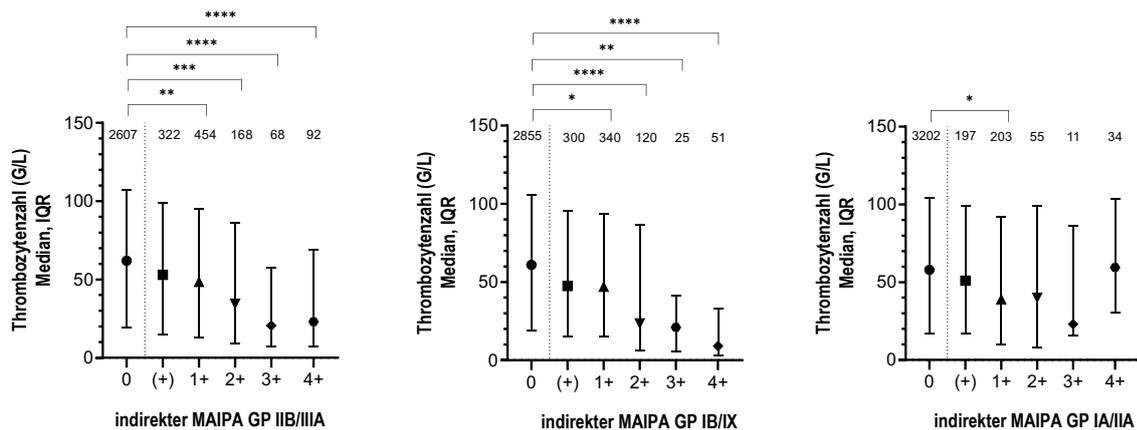


Abbildung 24: Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA

Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA (IM) gegen einen der Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/IIa. IM positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen den untersuchten Glykoproteinkomplex nachweisbar (GP IIb/IIIa: n=1104; GP Ib/IX: n=836; GP Ia/IIa: n=500). IM negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen den untersuchten Glykoproteinkomplex nicht nachweisbar (GP IIb/IIIa: n=2607; GP Ib/IX: n=2855; GP Ia/IIa: n=3202). Positive Ergebnisse sind nach einem semiquantitativen Score von (+) bis 4+ eingeteilt. Kruskal-Wallis Test: GP IIb/IIIa P<0.0001; GP Ib/IX P<0.0001; GP Ia/IIa P=0,0158. Nicht eingezeichnete Analysen zwischen den einzelnen Gruppen: nicht signifikant. Mann-Whitney Test der Patienten mit negativem (0) oder positivem ((+)-4+) Testergebnis nicht eingezeichnet: GP IIb/IIIa: P<0.0001, GP Ib/IX: P<0.0001, GP Ia/IIa: P=0.158). Fehlende Werte der Thrombozytenzahl: GP IIb/IIIa=535, GP Ib/IX=529, GP Ia/IIa=531.

Mediane Thrombozytenzahl bei den untersuchten Glykoproteinkomplexen:

Thrombozyten (G/L) IM: Ergebnis	GP IIb/IIIa		GP Ib/IX		GP Ia/IIa	
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR
0	62	19-107	61	19-106	58	17-104
(+)	53	14,75-99	47,5	15-95,75	51	17-99
1+	48,5	13-95	47	15-93,75	39	10-92
2+	34,5	9-86	23,5	6,25-86,5	40	8-99
3+	20,5	7-57,75	21	5,5-41	23	16-86
4+	23	7,25-69	9	3-33	59,5	30,5-103,3
Positiv ((+)-4+)	42	11-91	40	11-91	47,5	13-95,75

3.3.1.4 Bei Erwachsenen mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX zeigte der semiquantitative Score eine Assoziation mit der Thrombozytenzahl; diese war signifikant. Beim Glykoproteinkomplex GP Ia/IIa zeigte sich diese Assoziation nicht (*siehe* Abbildung 24 und Abbildung 25).

Bei Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP Ib/IX lag der Median der Thrombozytenzahl bei Patienten mit dem höchsten Score (4+) am niedrigsten (GP Ib/IX=40 G/L (IQR 24-68 G/L)); beim indirekten MAIPA GP IIb/IIIa bei Patienten mit dem zweithöchsten Score (3+) (GP IIb/IIIa=20,5 G/L (IQR 7-57,75 G/L)). Den höchsten Median der Thrombozytenzahl im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX hatten Patienten mit negativem

Testergebnis (GP IIb/IIIa=62 G/L (IQR 19-107 G/L), GP Ib/IX=61 G/L (IQR 19-106 G/L)).

Die Assoziation des semiquantitativen Scores mit den Medianen der Thrombozytenzahl ergab in der linearen Regressionsanalyse folgende R^2 -Werte (Spearman's rho r): GP IIb/IIIa: $R^2=0,9422$ ($r=-0,94$), GP Ib/IX: $R^2=0,9506$ ($r=-1,00$); beim GP Ia/IIa zeigte sich diese Assoziation nicht ($R^2=0,0848$ ($r=-0,086$)) (siehe Abbildung 25). Bei den Glykoproteinkomplexen GP IIb/IIIa und GP Ib/IX war diese signifikant (GP IIb/IIIa: $P = 0,0167$, GP Ib/IX: $P = 0,0028$, Spearman-Korrelationsanalyse).

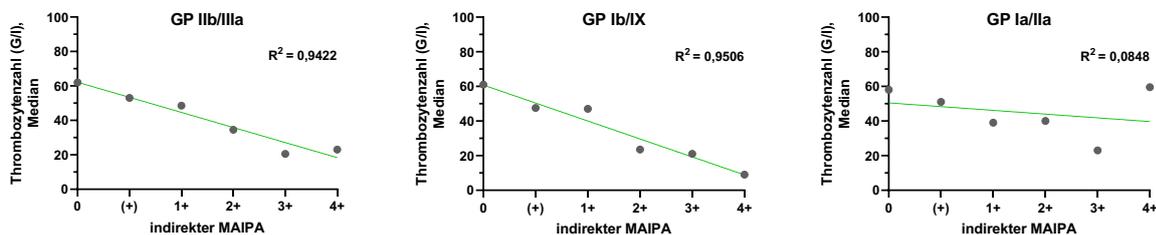


Abbildung 25: Geraden der linearen Regressionsanalyse der Ergebnisse des semiquantitativen Scores des indirekten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/IIa) und der Mediane der Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP

Die lineare Regressionsanalyse bei Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP und positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA und der Mediane der Thrombozytenzahl wurde für die Glykoproteine GP IIb/IIIa (links), GP Ib/IX (Mitte) und GP Ia/IIa (rechts) durchgeführt und ergab folgende Werte des Bestimmtheitsmaß: GP IIb/IIIa: $R^2=0,9422$, GP Ib/IX: $R^2=0,9506$, GP V: $R^2=0,0848$.

Kinder mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX und Erwachsene mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/IIa hatten, unabhängig von der Höhe des semiquantitativen Scores, signifikant niedrigere Thrombozytenzahlen als Patienten mit negativem Testergebnis, bei denen keine freien thrombozytären Antikörper gegen die drei Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/IIa nachgewiesen wurden (Kinder: $P = 0,0023$, Erwachsene: $P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test) (siehe Abbildung 26).

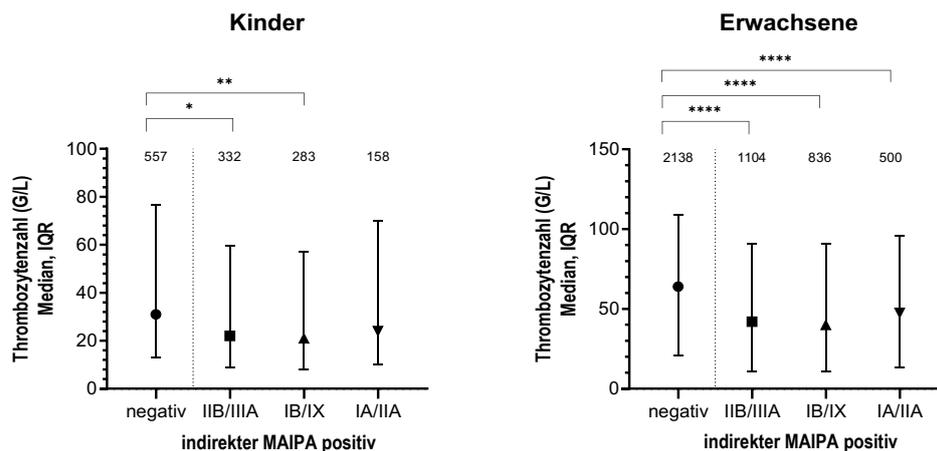


Abbildung 26: Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA

Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA (IM) gegen einen der Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/IIa. IM positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen den untersuchten Glykoproteinkomplex nachweisbar (Kinder: GP IIb/IIIa: n=332; GP Ib/IX: n=283; GP Ia/IIa: n=158; Erwachsene: GP IIb/IIIa: n=1104; GP Ib/IX: n=836; GP Ia/IIa: n=688). IM negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa nicht nachweisbar (Kinder: n=557, Erwachsene: n=2138). Kruskal-Wallis Test für Kinder: P=0,0023. Kruskal-Wallis Test für Erwachsene: P<0.0001. Nicht eingezeichnete Analysen zwischen den einzelnen Gruppen: nicht signifikant. Fehlende Werte der Thrombozytenzahl: Kinder=197, Erwachsene=647. Mediane Thrombozytenzahl bei den untersuchten Glykoproteinkomplexen:

	Kinder				Erwachsene			
	negativ	GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	GP Ia/IIa	negativ	GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	GP Ia/IIa
Median	31	22	21	24	64	42	40	47,5
IQR	13-76,5	9-59,5	8-57	10-70	20,75-109	11-91	11-91	13-95,75

3.3.2 Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität und Spezifität des indirekten MAIPA wurde bei Kindern und Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP anhand der in Tabelle 15 dargestellten Werte ermittelt. Die Berechnung wurde für jedes Glykoprotein (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa) einzeln durchgeführt. Wie beim direkten MAIPA wurde auch hier ein Diskriminierungswert der Thrombozytenzahl von < 100 G/L oder ≥ 100 G/L gewählt, da ein Wert < 100 G/L Thrombozyten in der Literatur als Diagnosekriterium der ITP genannt wird [59].

Tabelle 15: Positive und negative Testergebnisse im indirekten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa) und Thrombozytenzahl (TZ) bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP

Kinder			
GP IIb/IIIa	TZ < 100 G/L	TZ ≥ 100 G/L	Gesamt
Positiv	286	46	332
Negativ	561	125	686
Gesamt	847	171	1018

Erwachsene			
GP IIb/IIIa	TZ < 100 G/L	TZ ≥ 100 G/L	Gesamt
Positiv	876	228	1104
Negativ	1845	762	2607
Gesamt	2721	990	3711

GP Ib/IX	TZ < 100 G/L	TZ ≥ 100 G/L	Gesamt
Positiv	244	39	283
Negativ	596	129	725
Gesamt	840	168	1008

GP Ib/IX	TZ < 100 G/L	TZ ≥ 100 G/L	Gesamt
Positiv	675	161	836
Negativ	2034	821	2855
Gesamt	2709	982	3691

GP Ia/IIa	TZ < 100 G/L	TZ ≥ 100 G/L	Gesamt
Positiv	131	27	158
Negativ	713	142	855
Gesamt	844	169	1013

GP Ia/IIa	TZ < 100 G/L	TZ ≥ 100 G/L	Gesamt
Positiv	388	112	500
Negativ	2328	874	3202
Gesamt	2716	986	3702

Bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP und positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA konnte für das Glykoprotein GP IIb/IIIa eine Sensitivität von 33,77 % und eine Spezifität von 73,10 % berechnet werden. Der positive prädiktive Wert betrug 86,14 %. Die Sensitivität bei Kindern mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA GP Ib/IX betrug 29,05 %, die Spezifität 76,79 % und der positive prädiktive Wert 86,22 %. Für das Glykoprotein GP Ia/IIa wurden folgende Werte errechnet: Sensitivität 15,52 %, Spezifität 84,02 % und positiver prädiktiver Wert 82,91 %.

Bei Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP und positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa zeigte sich eine Sensitivität von 32,19 %, und eine Spezifität von 76,97 %; der positive prädiktive Wert lag bei 79,35 %. Die Sensitivität bei Erwachsenen mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA GP Ib/IX betrug 24,92 %, die Spezifität 83,60 % und der positive prädiktive Wert 80,74 %. Für das Glykoprotein GP Ia/IIa wurden folgende Werte errechnet: Sensitivität 14,95 %, Spezifität 88,64 % und positiver prädiktiver Wert 77,60 %.

Die Ergebnisse der Sensitivität, der Spezifität, des positiven und negativen prädiktiven Wertes sind in Tabelle 16 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 16: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und Ergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/IIa

Kinder				Erwachsene			
	GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	GP Ia/IIa		GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	GP Ia/IIa
Sensitivität	33,77 %	29,05 %	15,52 %	Sensitivität	32,19 %	24,92 %	14,29 %
Spezifität	73,10 %	76,79 %	84,02 %	Spezifität	76,79 %	83,60 %	88,64 %
Positiver prädiktiver Wert	86,14 %	86,22 %	82,91 %	Positiver prädiktiver Wert	79,35 %	80,74 %	77,60 %
Negativer prädiktiver Wert	18,22 %	17,79 %	16,61 %	Negativer prädiktiver Wert	29,23 %	28,76 %	27,30 %

3.3.3 Kombination mehrerer Glykoproteine

Danach wurde untersucht, inwiefern das gleichzeitige Vorliegen von freien thrombozytären Antikörpern gegen mehrere Glykoproteinkomplexe mit der Thrombozytenzahl assoziiert ist. Sowohl die Kombination von Antikörpern gegen die beiden im indirekten MAIPA untersuchten Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX, als auch die Kombination von Antikörpern gegen alle drei im indirekten MAIPA untersuchten Glykoproteinkomplexe (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa) wurde betrachtet. Zunächst wurden die Patienten stratifiziert, die ein positives oder negatives Testergebnis im indirekten MAIPA für die jeweils untersuchte Kombination von Glykoproteinkomplexen (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa) hatten (*siehe* Tabelle 13, Tabelle 14).

Zur Analyse der Testergebnisse der beiden Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX im indirekten MAIPA wurden je nach positivem/negativem Ergebnis die in Abbildung 27 dargestellten vier Gruppen gebildet.

Die Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX ist in Abbildung 27 dargestellt.

3.3.3.1 Die Thrombozytenzahl war bei Kindern mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX nicht signifikant niedriger als bei Kindern mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX (GP IIb/IIIa: $P > 0,05$; GP Ib/IX: $P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test); ein additiver Effekt der beiden Antikörperspezifitäten GP IIb/IIIa und GP Ib/IX zeigte sich nicht.

Bei 1.005 Kindern wurde der indirekte MAIPA für beide Glykoproteinkomplexe (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX) durchgeführt. 181 (18,01 %) Kinder hatten im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX ein positives Testergebnis. Bei 148 (14,73 %) Kindern wurden freie thrombozytäre Antikörper im indirekten MAIPA nur gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa nachgewiesen, bei 100 (9,95 %) nur gegen GP Ib/IX.

Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX mit 19 G/L (IQR 8-52,5 G/L) signifikant niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX (31 G/L (IQR 13-77,75 G/L)) ($P = 0,0029$, Kruskal-Wallis Test). Der Median der Thrombozytenzahl bei Patienten mit nur einer nachgewiesenen Antikörperspezifität im indirekten MAIPA (GP IIb/IIIa: 29,5 G/L (IQR 10,25-72,5 G/L); GP Ib/IX: 24 G/L (IQR 9-63,75 G/L)) war nicht signifikant unterschiedlich zu den Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX (19 G/L (IQR 8-52,5 G/L)) (GP IIb/IIIa: $P > 0,05$; GP Ib/IX: $P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Auch der Unterschied der Thrombozytenzahl der Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP Ib/IX war nicht signifikant ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test).

3.3.3.2 Die Thrombozytenzahl war bei Erwachsenen mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX signifikant niedriger als bei Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX (GP IIb/IIIa: $P = 0,0021$; GP Ib/IX: $P = 0,0162$, Kruskal-Wallis Test); ein additiver Effekt der beiden Antikörperspezifitäten GP IIb/IIIa und GP Ib/IX auf die Thrombozytenzahlerniedrigung konnte gezeigt werden.

Bei 3.685 Erwachsenen wurde der indirekte MAIPA für die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX durchgeführt. Einen positiven Nachweis von freien thrombozytären Antikörpern gegen die beiden Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX hatten 478 (12,97 %) Erwachsene. Freie Antikörper gegen einen der beiden Glykoproteinkomplexe wurden bei 615 (GP IIb/IIIa; 16,69 %) bzw. 357 (GP Ib/IX; 9,69 %) Erwachsenen nachgewiesen.

Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA für beide Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX hatten einen signifikant niedrigeren Median der Thrombozytenzahl (33 G/L (IQR 10-80,25 G/L)) als Patienten mit im indirekten MAIPA nachgewiesenen Antikörpern gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa (51 G/L (IQR 13-96 G/L)) oder GP Ib/IX (48 G/L (IQR 15-97 G/L)) (GP IIb/IIIa: $P = 0,0021$; GP Ib/IX: $P = 0,0162$, Kruskal-Wallis Test) oder mit negativem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX (64 G/L (IQR 21-109 G/L)) ($P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test). Der Unterschied der Thrombozytenzahl der Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP Ib/IX war nicht signifikant ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test).

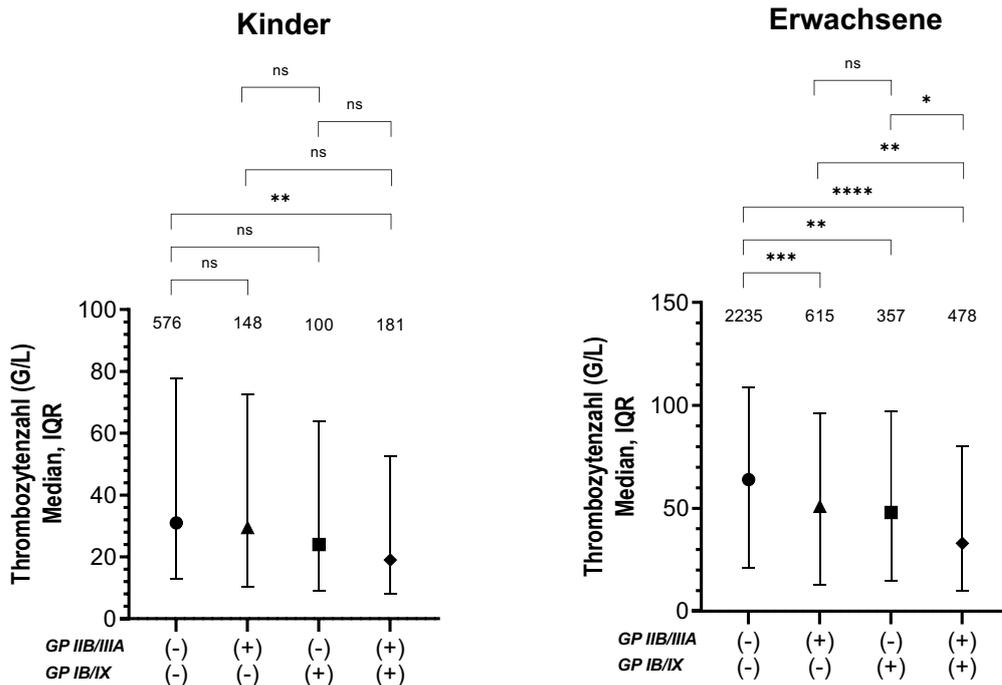


Abbildung 27: Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA für die Glykoproteine GP IIb/IIIa und GP Ib/IX

Thrombozytenzahl bei Kindern (n=1152) und Erwachsenen (n=4212) mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA (IM) gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX. IM positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen die untersuchten Glykoproteinkomplexe nachweisbar. IM negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen die untersuchten Glykoproteinkomplexe nicht nachweisbar. Kruskal-Wallis Test für Kinder: P=0,0055. Kruskal-Wallis Test für Erwachsene: P<0.0001. Gruppengrößen und Mediane der Thrombozytenzahl bei den untersuchten Glykoproteinkomplexen:

Kinder:

GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	n (1152)	Median	IQR	Fehlende Werte (n)
-	-	669	31	13-77,75	93
+	-	167	29,5	10,25-72,5	19
-	+	109	24	9-63,75	9
+	+	207	19	8-52,5	26

Erwachsene:

GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	n (4212)	Median	IQR	Fehlende Werte (n)
-	-	2566	64	21-109	331
+	-	715	51	13-96	100
-	+	398	48	15-97	41
+	+	533	33	10-80,25	55

Zur Analyse des Effekts von freien Antikörpern gegen alle drei im indirekten MAIPA untersuchten Glykoproteinkomplexe (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa) auf die Thrombozytenzahl wurden die in Abbildung 28 dargestellten Gruppen gebildet.

3.3.3.3 Die Thrombozytenzahl war bei Kindern und Erwachsenen mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa nicht signifikant niedriger als bei Patienten mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test); ein additiver Effekt auf die Thrombozytenzahlerniedrigung durch das Vorliegen einer weiteren Antikörperspezifität gegen den Glykoproteinkomplex GP Ia/IIa zeigte sich nicht.

Der indirekte MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa wurde bei 1.003 Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP durchgeführt. Bei 87 (8,67 %) Patienten wurden im indirekten MAIPA thrombozytäre Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX nachgewiesen, bei 94 (9,37 %) Patienten thrombozytäre Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa. Der Median der Thrombozytenzahl der Patienten mit zwei nachgewiesenen Antikörperspezifitäten im indirekten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX) lag bei 20 G/L (IQR 7-53 G/L) und unterschied sich nicht signifikant von den Patienten mit drei nachgewiesenen Antikörperspezifitäten (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa) (17 G/L (IQR 8-52,5 G/L)) ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test).

Bei 3.680 Erwachsenen wurde der indirekte MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa mit der Verdachtsdiagnose ITP durchgeführt. Bei 246 (6,68 %) Patienten wurden im indirekten MAIPA thrombozytäre Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX nachgewiesen, bei 232 (6,30 %) Patienten thrombozytäre Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa. Der Median der Thrombozytenzahl der Patienten mit zwei nachgewiesenen Antikörperspezifitäten im indirekten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX) lag bei 32 G/L (IQR 9,75-77,25 G/L) und unterschied sich nicht signifikant von den Patienten mit drei nachgewiesenen Antikörperspezifitäten (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa) (37,5 G/L (IQR 10-86 G/L)) ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test).

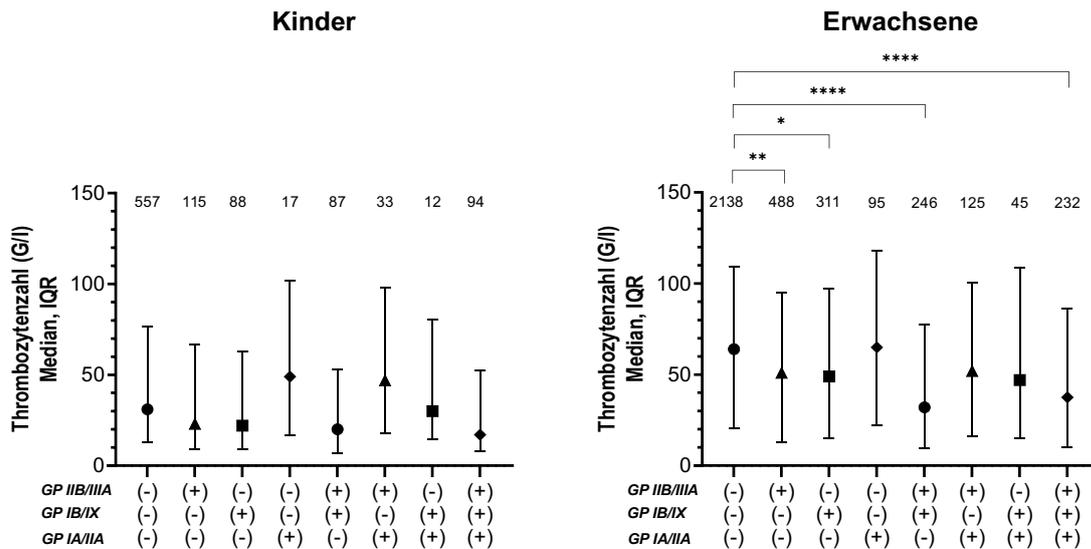


Abbildung 28: Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA für die Glykoproteine GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa

Thrombozytenzahl bei Kindern (n=1149) und Erwachsenen (n=4206) mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA (DM) gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa. IM positiv: Thrombozytenassoziierte freie Antikörper gegen die untersuchten Glykoproteinkomplexe nachweisbar. IM negativ: Thrombozytenassoziierte freie Antikörper gegen die untersuchten Glykoproteinkomplexe nicht nachweisbar. Kruskal-Wallis Test Kinder P=0,0088, Erwachsene: P< 0.0001. Nicht eingezeichnete Analysen zwischen den einzelnen Gruppen: nicht signifikant. Gruppengrößen und Mediane der Thrombozytenzahl bei den untersuchten Glykoproteinkomplexen:

Kinder:

GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	GP Ia/IIa	n (1149)	Median	IQR	Fehlende Werte (n)
-	-	-	648	31	13-76,5	91
+	-	-	126	23	9-67	11
-	+	-	96	22	9-62,75	8
-	-	+	19	49	16,5-102	2
+	+	-	97	20	7-53	10
+	-	+	41	47	18-98	8
-	+	+	13	30	14,5-80,5	1
+	+	+	109	17	8-52,5	15

Erwachsene:

GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	GP Ia/IIa	n (4206)	Median	IQR	Fehlende Werte (n)
-	-	-	2446	64	20,75-109	308
+	-	-	561	51	13-95	73
-	+	-	347	49	15-97	36
-	-	+	118	65	22-118	23
+	+	-	271	32	9,75-77,25	25
+	-	+	151	52	16-100,5	26
-	+	+	50	47	15-108,5	5
+	+	+	262	37,5	10-86	30

3.4 Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT)

In Abbildung 29 sind die Testergebnisse des Plättchenimmunfluoreszenztests (PIFT) bei Kindern und Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP dargestellt. Der PIFT wurde vor dem indirekten MAIPA durchgeführt; war der PIFT zweifach oder höher positiv ($\geq 2+$) schloss sich die Durchführung des indirekten MAIPAs an (siehe Abbildung 8). Der PIFT wurde bei fast allen Patienten durchgeführt (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: relativer Anteil der fehlenden Werte im Plättchenimmunfluoreszenztest bei Kindern und Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP

	Kinder (n=3548)		Erwachsene (n=15031)	
	Ergebnis im PIFT	Fehlende Werte	Ergebnis im PIFT	Fehlende Werte
PIFT	3526 (99,38 %)	22 (0,62 %)	14928 (99,31 %)	103 (0,69 %)

3.4.1.1 Die Thrombozytenzahl war bei Kindern mit positivem Testergebnis im PIFT signifikant niedriger als bei Kindern mit negativem Testergebnis ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test).

Der PIFT wurde bei 3.290 Kindern durchgeführt, davon hatten 821 (24,95 %) Kinder ein positives Testergebnis. Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Patienten mit positivem Testergebnis im PIFT (Score (+) - 4+) mit 40 G/L (IQR 15-89 G/L) signifikant niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis (58 G/L (IQR 23-115 G/L) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test).

Die positiven Testergebnisse des semiquantitativen Scores des PIFT und der Thrombozytenzahl wurden untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt (Kruskal-Wallis Test: $P < 0,0001$).

3.4.1.2 Bei Kindern mit positivem Testergebnis im PIFT zeigte der semiquantitative Score eine Assoziation mit der Thrombozytenzahl.

Bei Kindern mit positivem Testergebnis im PIFT lag der Median der Thrombozytenzahl bei Patienten mit dem höchsten Score (4+) am niedrigsten (19 G/L (IQR 9-55 G/L)). Den höchsten Median der Thrombozytenzahl hatten Patienten mit negativem Testergebnis im PIFT (58 G/L (IQR 23-115 G/L)). Die Assoziation des semiquantitativen Scores mit der Thrombozytenzahl ergab in der linearen Regressionsanalyse einen R^2 -Wert von 0,9579 (Kruskal-Wallis Test $P < 0,0001$).

3.4.1.3 Bei den Erwachsenen war die Thrombozytenzahl bei Patienten mit positivem Testergebnis im PIFT signifikant niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test).

Der PIFT wurde bei 14.150 Erwachsenen durchgeführt. Bei 2.584 (18,26 %) Erwachsenen wurden thrombozytäre Antikörper nachgewiesen. Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Patienten mit positivem Testergebnis (Score (+) - 4+) im PIFT mit 59,5 G/L (IQR 23-105 G/L) signifikant niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis (76 G/L (IQR 39-116 G/L) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test).

Die positiven Testergebnisse des semiquantitativen Scores des PIFT und der Thrombozytenzahl wurden untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt (Kruskal-Wallis Test: $P < 0,0001$).

3.4.1.4 Bei Erwachsenen mit positivem Testergebnis im PIFT zeigte der semiquantitative Score eine Assoziation mit der Thrombozytenzahl.

Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Erwachsenen mit positivem Testergebnis im PIFT bei Patienten mit dem höchsten Score (4+) am niedrigsten (37 G/L (IQR 12-86 G/L)). Den höchsten Median der Thrombozytenzahl hatten Patienten mit negativem Testergebnis im PIFT (76 G/L (IQR 39-116 G/L)). Die Assoziation des semiquantitativen Scores mit der Thrombozytenzahl ergab in der linearen Regressionsanalyse einen R^2 -Wert von 0,9041 (Kruskal-Wallis $P < 0,0001$).

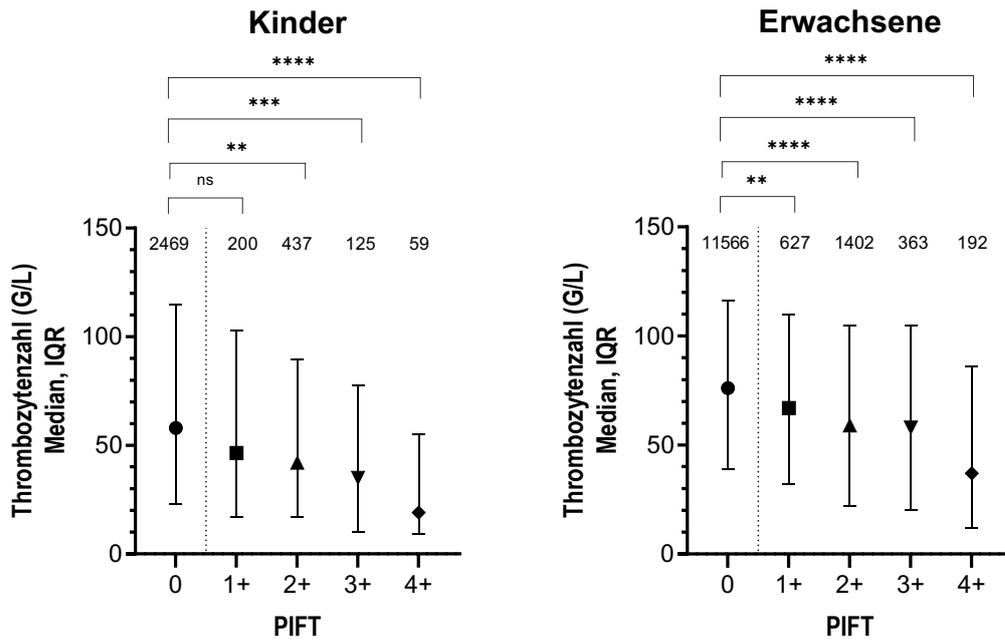


Abbildung 29: Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im PIFT

Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT). PIFT positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper nachweisbar (Kinder n=821, Erwachsene: n=2584). PIFT negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper nicht nachweisbar (Kinder n=2469, Erwachsene: n=11566). Positive Ergebnisse sind nach einem semi-quantitativen Score von 1+ bis 4+ eingeteilt. Kruskal-Wallis Test für Kinder und Erwachsene: $P < 0.0001$. Mann-Whitney Test der Patienten mit negativem (0) oder positivem (1+-4+) Testergebnis nicht eingezeichnet: Kinder und Erwachsene $P < 0.0001$. Fehlende Werte der Thrombozytenzahl: Kinder=236, Erwachsene=778. Mediane Thrombozytenzahl bei den untersuchten Gruppen:

Thrombozyten (G/L) / PIFT: Ergebnis	Kinder		Erwachsene	
	Median	IQR	Median	IQR
0	58	23-115	76	39-116
1+	46,5	17-102,8	67	32-110
2+	42	17-89,5	59	22-105
3+	35	10-77,5	58	20-105
4+	19	9-55	37	12-86
Positiv (1+-4+)	40	15-89	59,5	23-105

3.4.2 Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität und Spezifität des PIFT wurde bei Kindern und Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP anhand der in Tabelle 18 dargestellten Werte ermittelt.

Tabelle 18: Positive und negative Testergebnisse im Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT) und Thrombozytenzahl (TZ) bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP

Kinder			
	TZ < 100 G/L	TZ ≥ 100 G/L	Gesamt
Positiv	647	174	821
Negativ	1718	751	2469
Gesamt	2365	925	3290

Erwachsene			
	TZ < 100 G/L	TZ ≥ 100 G/L	Gesamt
Positiv	1881	703	2584
Negativ	7577	3989	11566
Gesamt	9458	4692	14150

Bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP und positivem oder negativem Testergebnis im PIFT konnte eine Sensitivität von 27,36 % und eine Spezifität von 81,19 % berechnet werden. Der positive prädiktive Wert betrug 78,81 %.

Bei Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP und positivem oder negativem Testergebnis im PIFT zeigte sich eine Sensitivität von 19,89 %, und eine Spezifität von 85,02 %; der positive prädiktive Wert lag bei 72,79 %.

Die Ergebnisse der Sensitivität, der Spezifität, des positiven und negativen prädiktiven Wertes sind in Tabelle 19 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 19: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und Ergebnis im Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT)

	Kinder	Erwachsene
Sensitivität	27,36 %	19,89 %
Spezifität	81,19 %	85,02 %
Positiver prädiktiver Wert	78,81 %	72,79 %
Negativer prädiktiver Wert	30,42 %	34,49 %

3.5 Kombination direkter und indirekter MAIPA

Anschließend wurde untersucht, wie sich das gleichzeitige Vorkommen von freien und gebundenen thrombozytären Antikörpern gegen einen Glykoproteinkomplex (GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX) auf die Thrombozytenzahl auswirkt. Zunächst erfolgte eine Stratifizierung der Kinder und Erwachsenen nach ihren Testergebnissen im direkten und indirekten MAIPA für die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX (*siehe* Abbildung 30 und Abbildung 31). Für die folgende Analyse wurde eine Subgruppe der Kinder/Erwachsenen gebildet, bei denen positive oder negative Testergebnisse sowohl im direkten als auch im indirekten MAIPA vorlagen; dadurch ist die Stichprobengröße der untersuchten Gruppen bei dieser Untersuchung geringer als in der in 3.2.1 aufgeführten alleinigen Untersuchung des direkten MAIPA (*siehe* Tabelle 20).

Tabelle 20: Gegenüberstellung der Stichprobengröße der untersuchten Gruppen "Testergebnis im direkten MAIPA (DM)" und "Testergebnis im direkten MAIPA (DM) und indirekten MAIPA (IM)" für die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX

	Testergebnis GP IIb/IIIa		Testergebnis GP Ib/IX	
	DM	DM und IM	DM	DM und IM
Kinder (n)	2720	628	2187	488
Erwachsene (n)	13301	3071	12369	2696

3.5.1.1 Die Thrombozytenzahl war bei Kindern mit positivem Nachweis freier und gebundener Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX im direkten und indirekten MAIPA nicht signifikant niedriger als bei Kindern mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA und negativem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Ein mit der Thrombozytenzahl assoziierter additiver Effekt durch zusätzliche freie Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX zeigte sich nicht.

In Abbildung 30 sind die Thrombozytenzahlen der Kinder mit der Verdachtsdiagnose ITP, die ein Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA für die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX haben, dargestellt.

Bei 627 Kindern wurde der direkte MAIPA und der indirekte MAIPA für den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa durchgeführt. 101 (16,11 %) Kinder hatten im direkten und im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa ein positives Testergebnis. Bei 61 (9,73 %) Kindern wurden nur gebundene Antikörper gegen das Glykoprotein GP IIb/IIIa im direkten MAIPA nachgewiesen, bei 101 (16,11 %) Kindern nur freie Antikörper gegen das Glykoprotein GP IIb/IIIa im indirekten MAIPA. Der Median der Thrombozytenzahl war bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA GP IIb/IIIa mit 30 G/L (IQR 13-56 G/L) niedriger als bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa und negativem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa (40 G/L (IQR 23,5-77,5 G/L)); der Unterschied war nicht signifikant ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Der Median der Thrombozytenzahl der Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa und positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa (Median: 51 G/L (IQR 20-123 G/L)) und der Patienten mit positivem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA GP IIb/IIIa (Median: 30 G/L (IQR 13-56 G/L)) unterschied sich signifikant ($P = 0,0006$, Kruskal-Wallis Test). Patienten, bei denen nur gebundene Antikörper im direkten MAIPA GP IIb/IIIa nachgewiesen wurden, hatten eine niedrigere Thrombozytenzahl (40 G/L (IQR 23,5-77,5 G/L)) als Patienten, die nur freie Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa hatten (51 G/L (IQR 20-123 G/L)); der Unterschied war nicht signifikant ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test).

Der direkte und indirekte MAIPA GP Ib/IX wurde bei 465 Kindern durchgeführt. 58 (12,47 %) Kinder hatten ein positives Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA GP Ib/IX. Bei 33 (7,10 %) Kindern war nur der direkte MAIPA GP Ib/IX positiv, bei

57 (12,26 %) nur der indirekte MAIPA GP Ib/IX. Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA GP Ib/IX mit 47 G/L (IQR 23-63 G/L) niedriger als bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP Ib/IX und negativem Testergebnis im indirekten MAIPA GP Ib/IX (66 G/L (IQR 26-95,5 G/L)); der Unterschied war nicht signifikant ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Der Unterschied der Thrombozytenzahl der Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA GP Ib/IX und positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP Ib/IX (Median: 77 G/L (IQR 43-197,5 G/L)) und der Patienten mit positivem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA GP Ib/IX (Median: 47 G/L (IQR 23-63 G/L)) war signifikant ($P = 0,0005$, Kruskal-Wallis Test). Die Thrombozytenzahl bei Patienten, bei denen nur gebundene Antikörper im direkten MAIPA GP Ib/IX nachgewiesen wurden, unterschied sich nicht signifikant von den Patienten, bei denen nur freie Antikörper im indirekten MAIPA GP Ib/IX nachgewiesen wurden ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test).

In der hier durchgeführten Analyse der Subgruppen „Kinder mit Testergebnis für direkten und indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX“ (siehe Tabelle 20) war der Median der Thrombozytenzahl der Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA (und negativem Testergebnis im indirekten MAIPA) niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA (und negativem Testergebnis im indirekten MAIPA); der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($P > 0,05$ Kruskal-Wallis Test).

Die Mediane der Thrombozytenzahl bei Kindern mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA GP IIb/IIIa waren niedriger als bei Kindern mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA GP Ib/IX (siehe Abbildung 30).

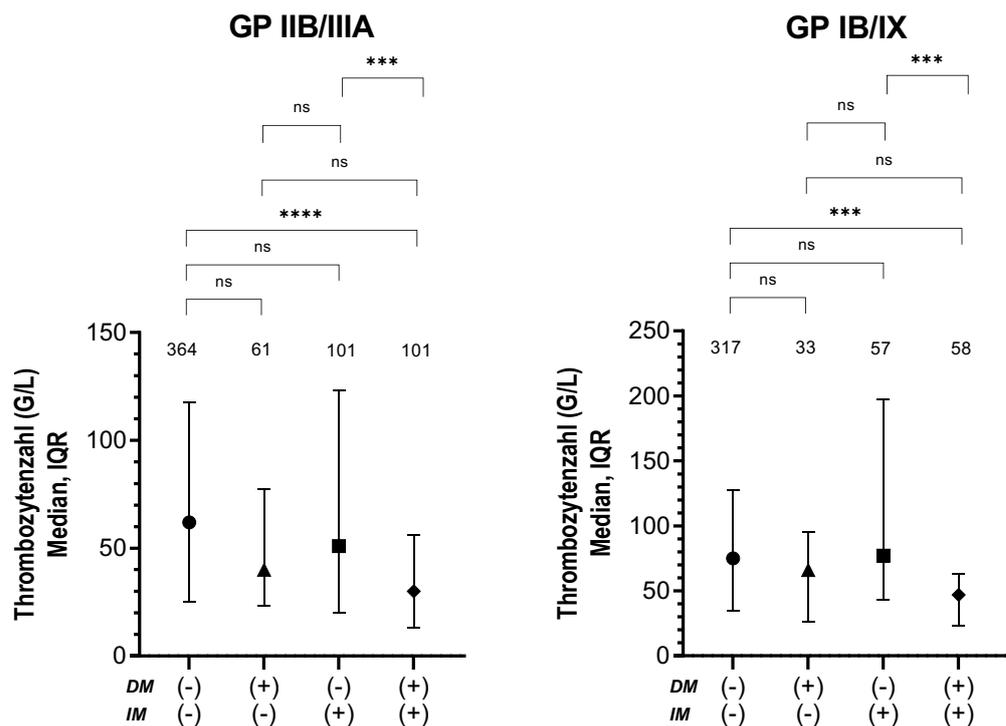


Abbildung 30: Thrombozytenzahl bei Kindern mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA für den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX

Thrombozytenzahl bei Kindern mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA (DM) und im indirekten MAIPA (IM) gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa (links, n=628) oder GP Ib/IX (rechts, n=466). DM/IM positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen den untersuchten Glykoproteinkomplex nachweisbar. DM/IM negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen den untersuchten Glykoproteinkomplex nicht nachweisbar. Kruskal-Wallis Test für GP IIb/IIIa und GP Ib/IX: $P < 0.0001$. Mediane Thrombozytenzahl bei den untersuchten Glykoproteinkomplexen:

GP IIb/IIIa:

DM	IM	n (628)	Median	IQR	Fehlende Angaben
-	-	365	62	25-117,5	1
+	-	61	40	23,5-77,5	0
-	+	101	51	20-123	0
+	+	101	30	13-56	0

GP Ib/IX:

DM	IM	n (466)	Median	IQR	Fehlende Angaben
-	-	318	75	35-127,5	1
+	-	33	66	26-95,5	0
-	+	57	77	43-197,5	0
+	+	58	47	23-63	0

3.5.1.2 Bei Erwachsenen mit positivem Nachweis freier und gebundener Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX im direkten und indirekten MAIPA war die Thrombozytenzahl nicht signifikant niedriger als bei Erwachsenen mit positivem Nachweis gebundener Antikörper im direkten MAIPA und negativem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Ein mit der Thrombozytenzahl assoziierter additiver Effekt durch zusätzliche freie Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX zeigte sich nicht.

In Abbildung 31 sind die Thrombozytenzahlen der Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP, die ein Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA für den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa und GP Ib/IX haben, dargestellt.

Bei 3.066 Erwachsenen wurde der direkte MAIPA und der indirekte MAIPA für den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa durchgeführt. 296 (9,65 %) Erwachsene hatten im direkten und indirekten MAIPA GP IIb/IIIa ein positives Testergebnis. Bei 184 (6,00 %) Erwachsenen wurden nur gebundene Antikörper gegen das Glykoprotein GP IIb/IIIa im direkten MAIPA nachgewiesen, bei 574 (18,72 %) nur freie Antikörper gegen das Glykoprotein GP IIb/IIIa im indirekten MAIPA. Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA GP IIb/IIIa mit 33 G/L (IQR 15-73 G/L) nicht signifikant niedriger als bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa und negativem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa (40 G/L (IQR 17-67,75 G/L)) ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Signifikant war der Unterschied der Thrombozytenzahl bei Patienten, die nur ein positives Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa hatten (71,5 G/L (IQR 35-110,3 G/L)) und den Patienten mit positivem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA GP IIb/IIIa (33 G/L (IQR 15-73 G/L)) ($P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test). Patienten, bei denen nur gebundene Antikörper im direkten MAIPA GP IIb/IIIa nachgewiesen wurden, hatten mit 40 G/L (IQR 17-67,75 G/L) eine signifikant niedrigere Thrombozytenzahl als Patienten, die nur freie Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa hatten (71,5 G/L (IQR 35-110,3 G/L)) ($P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test).

Der direkte und indirekte MAIPA GP Ib/IX wurde bei 2.693 Erwachsenen durchgeführt. 160 (5,94 %) Erwachsene hatten im direkten und indirekten MAIPA GP Ib/IX ein positives Testergebnis. 124 (4,60 %) Erwachsene hatten nur im direkten MAIPA GP Ib/IX ein positives Testergebnis, 388 (14,41 %) nur im direkten MAIPA GP Ib/IX. Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA GP Ib/IX mit 41,5 G/L (IQR 24-77 G/L) nicht signifikant

niedriger als bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP Ib/IX und negativem Testergebnis im indirekten MAIPA GP Ib/IX (48,5 G/L (IQR 22-77,75 G/L)) ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Signifikant war der Unterschied der Thrombozytenzahl bei Patienten, die nur ein positives Testergebnis im indirekten MAIPA GP Ib/IX hatten (80 G/L (IQR 44-114 G/L)) und den Patienten mit positivem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA GP Ib/IX (41,5 G/L (IQR 24-77 G/L)) ($P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test). Patienten, bei denen nur gebundene Antikörper im direkten MAIPA GP Ib/IX nachgewiesen wurden, hatten mit 48,5 G/L (IQR 22-77,75 G/L) eine signifikant niedrigere Thrombozytenzahl als Patienten, die nur freie Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP Ib/IX hatten (80 G/L (IQR 44-114 G/L)) ($P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test).

In der hier durchgeführten Analyse der Subgruppen „Erwachsene mit Testergebnis für direkten und indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX“ (siehe Tabelle 20) war der Median der Thrombozytenzahl der Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA (und negativem Testergebnis im indirekten MAIPA) niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA (und negativem Testergebnis im indirekten MAIPA); der Unterschied war signifikant (GP IIb/IIIa und GP Ib/IX: $P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test).

Die Mediane der Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA GP IIb/IIIa waren niedriger als bei Erwachsenen mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA GP Ib/IX (siehe Abbildung 31).

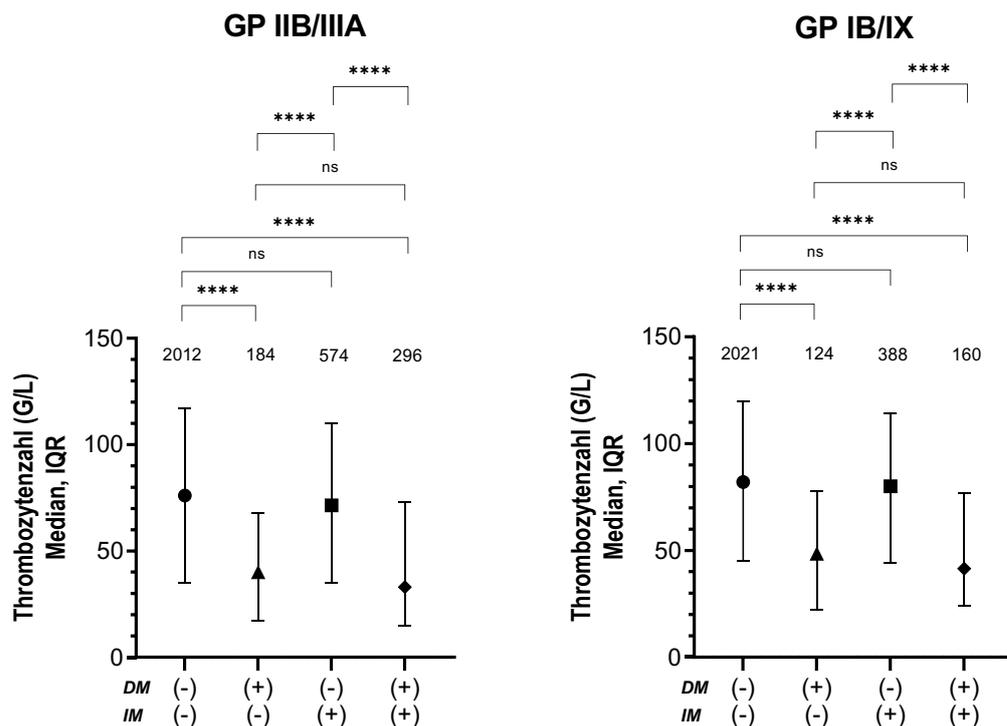


Abbildung 31: Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA

Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA (DM) und im indirekten MAIPA (IM) gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa (links, n=3066) oder GP Ib/IX (rechts, n=2693). DM/IM positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen den untersuchten Glykoproteinkomplex nachweisbar. DM/IM negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen den untersuchten Glykoproteinkomplex nicht nachweisbar. Kruskal-Wallis Test für GP IIb/IIIa und GP Ib/IX: $P < 0.0001$. Mediane Thrombozytenzahl bei den untersuchten Glykoproteinkomplexen:

GP IIb/IIIa:

DM	IM	n (3071)	Median	IQR	Fehlende Angaben
-	-	2014	76	35-117	2
+	-	184	40	17-67,75	0
-	+	575	71,5	35-110,3	1
+	+	298	33	15-73	2

GP Ib/IX:

DM	IM	n (2696)	Median	IQR	Fehlende Angaben
-	-	2024	82	45-120	3
+	-	124	48,5	22-77,75	0
-	+	388	80	44-114	0
+	+	160	41,5	24-77	0

Zuletzt wurde das gleichzeitige Vorliegen von freien und gebundenen Antikörpern sowohl gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa als auch GP Ib/IX untersucht.

3.5.1.3 Die Thrombozytenzahl war bei Kindern und Erwachsenen mit positivem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX nicht signifikant niedriger als bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX und negativem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Ein additiver Effekt durch das zusätzliche Vorkommen von freien Antikörpern gegen die beiden Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX zeigte sich nicht.

Die bei der Analyse gebildeten Gruppen und die genauen Ergebnisse finden sich im Anhang (siehe 8.4 Weitere Ergebnisse).

3.6 Kombination direkter MAIPA und PIFT

Ferner wurde die Kombination direkter MAIPA und PIFT hinsichtlich einer möglichen Assoziation mit der Thrombozytenzahl untersucht. Die Analyse der Kombination indirekter MAIPA und PIFT wurde aufgrund einer geringen Stichprobengröße der betreffenden Gruppen nicht durchgeführt.

Zunächst erfolgte eine Stratifizierung der Kinder und Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP nach ihren Testergebnissen im direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V) und im PIFT (siehe Abbildung 32). Für die folgende Analyse wurde eine Subgruppe der Kinder/Erwachsenen gebildet, bei denen positive oder negative Testergebnisse sowohl im direkten MAIPA als auch im PIFT vorlagen. Dadurch ist die Stichprobengröße der untersuchten Gruppen bei dieser Untersuchung geringer als bei der in 3.2.1 aufgeführten alleinigen Untersuchung des direkten MAIPA (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Gegenüberstellung der Stichprobengrößen der untersuchten Gruppen "Testergebnis im direkten MAIPA (DM) " und "Testergebnis im direkten MAIPA (DM) und PIFT"

	Testergebnis	
	DM	DM und PIFT
Kinder (n)	2720	1947
Erwachsene (n)	13301	10993

3.6.1.1 Die Thrombozytenzahl war bei Kindern mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V) und positivem Testergebnis im PIFT nicht signifikant niedriger als bei Kindern mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V) und negativem Testergebnis im PIFT ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Bei Erwachsenen mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V) und positivem Testergebnis im PIFT war die Thrombozytenzahl signifikant niedriger als bei Erwachsenen mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V) und negativem Testergebnis im PIFT ($P = 0,0002$, Kruskal-Wallis Test).

In Abbildung 32 sind die Thrombozytenzahlen der Kinder und Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP, die ein Testergebnis im direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V) und im PIFT hatten, dargestellt.

Bei 1.944 Kindern wurde der direkte MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V) und der PIFT durchgeführt. 180 (9,26 %) Kinder hatten im direkten MAIPA und im PIFT ein positives Testergebnis. 393 (20,22 %) Kinder hatten ein positives Testergebnis im direkten MAIPA und ein negatives Testergebnis im PIFT; ein positives Testergebnis im PIFT und ein negatives im direkten MAIPA hatten 277 (14,25 %) Kinder. Negative Testergebnisse im direkten MAIPA und im PIFT hatten 1.094 (56,27 %) Kinder.

Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Kindern mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA und im PIFT mit 39 G/L (20-71 G/L) nicht signifikant niedriger als bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA und negativem Testergebnis im PIFT (40 G/L (21-82 G/L)) ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Der Unterschied der Thrombozytenzahl der Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA und positivem Testergebnis im PIFT (91 G/L (51,5-148,5 G/L)) und der Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA und negativem Testergebnis im PIFT (40 G/L (21-82 G/L)) war signifikant ($P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test). Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA und im PIFT hatten mit einem Median der Thrombozytenzahl von 39 G/L (20-71 G/L) einen signifikant niedrigeren Wert als Patienten mit einem negativen Testergebnis im direkten MAIPA und im PIFT (99 G/L (58-155 G/L)) ($P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test). Nicht signifikant unterschiedlich war der Median der Thrombozytenzahl der Patienten mit positivem Testergebnis im PIFT und negativem Testergebnis im direkten MAIPA (91 G/L (51,5-148,5 G/L)) und der Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA und PIFT (99 G/L (58-155 G/L)) ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test).

Bei 10.974 Erwachsenen wurde der direkte MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V) und der PIFT durchgeführt. 517 (4,71 %) Patienten hatten im direkten MAIPA und im PIFT ein positives Testergebnis. 1.328 (12,10 %) Patienten hatten ein positives Testergebnis im direkten MAIPA und ein negatives Testergebnis im PIFT; ein positives Testergebnis im PIFT und ein negatives im direkten MAIPA hatten 1.421 (12,95 %) Patienten. Ein negatives Testergebnis im direkten MAIPA und im PIFT hatten 7.708 (70,24 %) Patienten.

Der Median der Thrombozytenzahl lag bei Erwachsenen mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA und im PIFT mit 41 G/L (17-77 G/L) signifikant niedriger als bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA und negativem Testergebnis im PIFT (52 G/L (24-90 G/L)) ($P = 0,0002$, Kruskal-Wallis Test). Der Unterschied der Thrombozytenzahl der Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA und positivem Testergebnis im PIFT (88 G/L (56-124 G/L)) und der Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA und negativem Testergebnis im PIFT (52 G/L (24-90 G/L)) war signifikant ($P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test). Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA und im PIFT hatten mit einem Median der Thrombozytenzahl von 41 G/L (17-77 G/L) einen signifikant niedrigeren Wert als Patienten mit einem negativen Testergebnis im direkten MAIPA und im PIFT (88 G/L (56-124 G/L)) ($P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test). Ebenfalls unterschiedlich war der Median der Thrombozytenzahl der Patienten mit positivem Testergebnis im PIFT und negativem Testergebnis im direkten MAIPA (84 G/L (51-119 G/L)) und den Patienten mit negativem Testergebnis im direkten MAIPA und PIFT (88 G/L (56-124 G/L)), der Unterschied war mit einem P-Wert = 0,0144 leicht signifikant (*) (Kruskal-Wallis Test).

Ein mit der Thrombozytenzahl assoziierter additiver Effekt durch das zusätzliche Vorkommen eines positiven Testergebnisses im PIFT zeigte sich bei Kindern mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V) nicht ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Bei den Erwachsenen mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V) hingegen konnte ein signifikanter Effekt durch das zusätzliche Vorkommen eines positiven Testergebnisses im PIFT auf die Thrombozytenzahlerniedrigung gezeigt werden ($P = 0,0002$, Kruskal-Wallis Test).

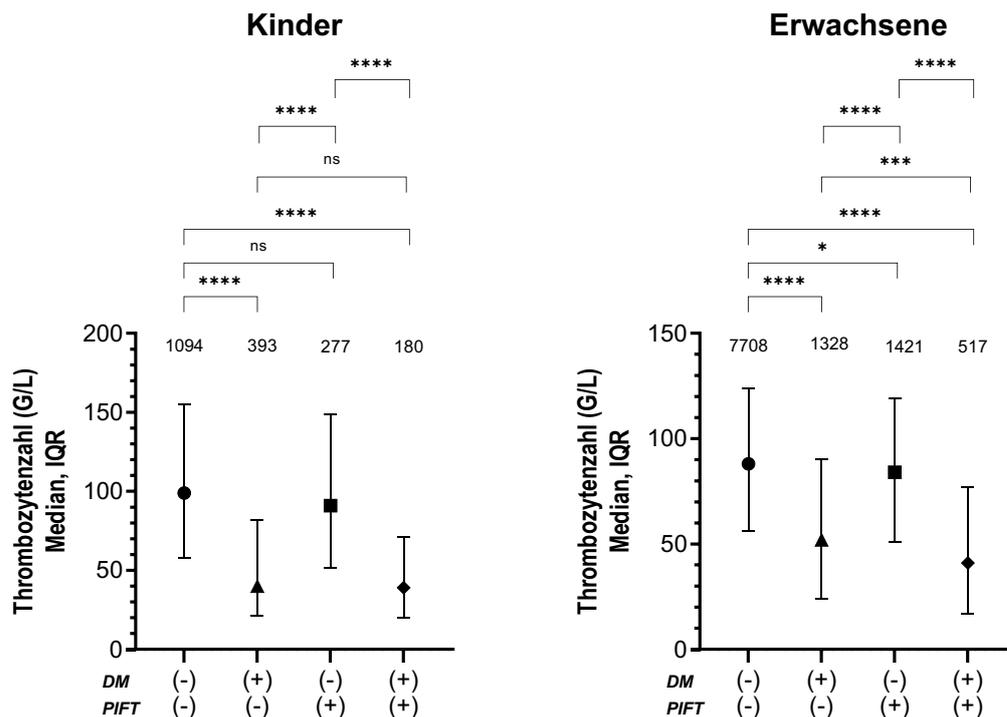


Abbildung 32: Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA und im PIFT

Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA (DM) und im Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT) (Kinder: n=1947; Erwachsene: n=10993). DM positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen die untersuchten Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V nachweisbar. PIFT positiv: Thrombozytenassoziierte Antikörper nachweisbar. DM negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper gegen die untersuchten Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V nicht nachweisbar. PIFT negativ: Thrombozytenassoziierte Antikörper nicht nachweisbar. Kruskal-Wallis Test für Kinder und Erwachsene: P<0.0001.

Mediane Thrombozytenzahl bei Kindern:

DM	PIFT	n (1947)	Median	IQR	Fehlende Angaben
-	-	1096	99	58-155	2
+	-	393	40	21-82	0
-	+	278	91	51,5-148,5	1
+	+	180	39	20-71	0

Mediane Thrombozytenzahl bei Erwachsenen:

DM	PIFT	n (10993)	Median	IQR	Fehlende Angaben
-	-	7721	88	56-124	13
+	-	1329	52	24-90	1
-	+	1424	84	51-119	3
+	+	519	41	17-77	2

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 18.579 Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP aus dem Thrombozytenlabor des Instituts für Klinische Immunologie, Transfusionsmedizin und Hämostaseologie der Justus-Liebig-Universität Gießen hinsichtlich der Fragestellung „Assoziation zwischen dem Nachweis von thrombozytären Autoantikörpern und Schweregrad der Immuntrombozytopenie“ untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von thrombozytären Autoantikörpern gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GPV bei Kindern und Erwachsenen mit dem Schweregrad der Immuntrombozytopenie assoziiert ist.

4.1 Einordnung der Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Das Besondere an dieser Arbeit ist die Zusammensetzung des Patientenkollektivs. Wir haben Patienten analysiert, bei denen im Zeitraum vom 01.01.2000 bis zum 30.06.2019 der Verdacht auf eine ITP bestand. Bisherige Studien zur Bedeutung von thrombozytären Autoantikörpern bei der ITP haben sich hauptsächlich auf Patientengruppen konzentriert, bei denen die Diagnose ITP bereits gestellt wurde [1, 86, 93, 95]. Im Folgenden wird hierauf näher eingegangen.

Soweit bekannt, ist bisher keine Studie zur Assoziation von thrombozytären Autoantikörpern und dem Schweregrad der ITP bei Patienten ohne a priori Annahme der Diagnose beschrieben worden. Dadurch ist die Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit in die aktuelle Literatur teils erschwert. In einer Studie von Porcelijn et al. wird der direkte MAIPA bei 165 Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP durchgeführt, jedoch fehlt eine detaillierte Analyse des Schweregrades der Thrombozytopenie der einzelnen Patientengruppen (positiver/negativer direkter MAIPA) [85].

4.2 ITP-Patientenkollektiv

Bei den 3.548 Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP dieser Arbeit sind 45,66 % weiblich und 54,34 % männlich (Verhältnis Mädchen zu Jungen 1:1,19). Die 15.031 Erwachsenen setzen sich aus 47,16 % Frauen und 52,84 % Männern zusammen (Verhältnis 1:1,12). Epidemiologische Studien zur ITP variieren hinsichtlich des Studiendesigns, der Einschlusskriterien und der Ergebnisse [48]. Kohli & Chaturvedi kommen in ihrer Übersichtsarbeit zur Epidemiologie der ITP zu dem Ergebnis, dass Frauen insgesamt häufiger betroffen sind, während männliche Patienten im Kindesalter und im Alter über 75 Jahren häufiger betroffen sind [48, 97]. Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist eingeschränkt möglich, da in der Literatur Angaben von Patienten mit diagnostizierter ITP vorliegen [48, 97]. Das Geschlechterverhältnis der Kinder mit der Verdachtsdiagnose ITP dieser Arbeit entspricht dem der Kinder mit

diagnostizierter ITP in der Literatur, während bei den Erwachsenen ein umgekehrtes Geschlechterverhältnis vorliegt [48, 97].

Der Altersmedian bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP ist mit 9 Jahren (IQR 4-14) über dem von Kühne et al. angegebenen Mittelwert von 5,4 Jahren [50]. Auch Singh et al. geben einen Häufigkeitsgipfel von 2-5 Jahren an [101]. Anzumerken ist jedoch, dass bei den genannten Studien andere Altersgrenzen genutzt wurden (16 und 17 Jahre in den Studien vs. 18 Jahre in dieser Arbeit) [50, 101]. Bei den Erwachsenen liegt der Altersmedian mit 60 Jahren (IQR 43-72) im oberen Bereich der in der Literatur schwankenden Angaben von 39-65 Jahren [1, 29, 49, 50, 70, 77]. Matzdorff et al. haben 2020 eine Tendenz zu einem höheren, mittleren Erkrankungsalter um die 60 Jahre beobachtet, was mit dem Patientenkollektiv dieser Arbeit übereinstimmt [59].

Nach internationaler Übereinkunft spricht man von einer ITP, wenn die Thrombozytenzahl < 100 G/L liegt [59]. Rodeghiero führte hierzu 2009 eine Standardisierung der ITP-Terminologie und Definition ein [91]. In dieser Arbeit liegt der Median der Thrombozytenzahl bei den Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP bei 53 G/L (IQR 20-109), bei den Erwachsenen bei 74 G/L (IQR 36-115 G/L); der Unterschied zwischen Jungen und Mädchen ist nicht signifikant, bei den Erwachsenen haben Männer (71 G/L (IQR 34-111 G/L) signifikant niedrigere Thrombozytenzahlen als Frauen (76 G/L (IQR 38-120 G/L) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test). Frederiksen & Schmidt bestätigen diesen Einfluss des Geschlechts in ihrer Studie; Männer haben signifikant niedrigere Thrombozytenzahlen als Frauen [29]. Die Verteilung der Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen ist linksgipflig. Im Vergleich zu Erwachsenen haben Kinder signifikant niedrigere Thrombozytenzahlen ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test). Kühne et al. haben in ihrer Studie ebenfalls festgestellt, dass die Verteilung der Thrombozytenzahl linksgipflig ist und niedrige Thrombozytenwerte häufiger bei Kindern vorkommen [50].

4.3 Direkter MAIPA

4.3.1 Stellung des direkten MAIPA in der Diagnostik der ITP

Bei den Patienten wurde unter anderem der direkte MAIPA durchgeführt, der Teil des Laborprofils „V.a. ITP“ in unserem Thrombozytenlabor ist. Im direkten MAIPA können glykoproteinspezifisch zellgebundene thrombozytäre Autoantikörper nachgewiesen werden [43]. Ein positives Testergebnis im direkten MAIPA ist ein zuverlässiger Prädiktor für das Vorliegen einer ITP [93, 102].

4.3.2 Nachweis thrombozytärer Antikörper gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V

Eine Fragestellung dieser Arbeit ist, inwiefern der Nachweis thrombozytärer Autoantikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V und die Thrombozytenzahl bei Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP assoziiert sind und welche klinische Relevanz sich dadurch für die ITP ergibt. Neben den Hauptzielantigenen GP IIb/IIIa und GP Ib/IX, haben Vollenberg et al. gezeigt, dass auch das Glykoprotein GP V ein relevantes Zielantigen der ITP darstellt [113].

In dieser Arbeit haben Jungen und Mädchen gleich häufig ein positives Testergebnis im direkten MAIPA (weiblich: 287 (50,09 %); männlich: 286 (49,91 %)). Bei den Erwachsenen sind 973 (52,34 %) der Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA weiblich, 886 (47,66 %) männlich. Fabris et al. berichten in ihrer Studie von einer überwiegenden Anzahl von Frauen mit nachgewiesenen thrombozytären Antikörpern, wobei der Anteil bei 76 % liegt und somit höher als in dieser Arbeit. Allerdings ist zu beachten, dass die Studienkohorte nur aus 25 Patienten bestand [27].

Der Median der Thrombozytenzahl ist bei Patienten mit positivem Nachweis thrombozytärer Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V im direkten MAIPA signifikant niedriger als bei Patienten mit negativem Testergebnis thrombozytärer Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V; dies gilt für Kinder (positiv: 39 G/L (IQR 20-78,5 G/L), negativ: 97,5 G/L (58-154 G/L)) und Erwachsene (positiv: 48 G/L (IQR 21-86 G/L), negativ: 88 G/L (55-124 G/L)) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test). Bei der separaten Betrachtung der einzelnen Glykoproteine (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V) ist der Nachweis thrombozytärer Autoantikörper mit einer Thrombozytenzahlerniedrigung assoziiert. Bereits bei einem grenzwertig positiven (+) Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX bei Kindern und GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V bei Erwachsenen ist ein signifikanter Unterschied zu Patienten mit negativem Testergebnis für das jeweilige Glykoprotein festzustellen (Kinder: GP IIb/IIIa: $P = 0,0007$, GP Ib/IX: $P = 0,0032$; Erwachsene: GP IIb/IIIa: $P < 0,0001$, GP Ib/IX: $P < 0,0001$, GP V: $P = 0,0004$; Kruskal-Wallis Test). Diese Ergebnisse legen nahe, dass schon geringe Antikörpermengen einen Einfluss auf die Thrombozytenzahlerniedrigung haben. In der Übersichtsarbeit von Porcelijn et al. zur Bewertung der relevanten Literatur von 1984-2020 zum Nachweis glykoproteinspezifischer Antikörper bei ITP-Patienten wird deutlich, dass in vielen Studien die Angabe der Thrombozytenzahl fehlt [86]. In 15 von 27 untersuchten Studien wird die Thrombozytenzahl der Patienten angegeben; in nur 4 davon wird zwischen der Thrombozytenzahl bei Patienten mit und ohne Antikörpernachweis unterschieden [22, 27, 86]. Hervorzuheben ist, dass bei diesen Studien nur Patienten

mit der gestellten Diagnose ITP inkludiert wurden [86]. Davoren et al. haben bei ITP-Patienten mit positivem Nachweis von thrombozytären Antikörpern niedrigere Thrombozytenzahlen ($72 \text{ G/L} \pm 11 \text{ G/L}$) beobachtet als bei Patienten ohne ($87 \text{ G/L} \pm 9 \text{ G/L}$); dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($P = 0,3$) [22]. Es ist zu beachten, dass der Nachweis der Antikörper durch eine andere direkte Labormethode (PakAuto) erfolgte, nur der Mittelwert der Thrombozytenzahl angegeben war und die analysierten Antigenspezifitäten (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa) von denen in dieser Arbeit abweichen [22]. Auch Fabris et al. stellen niedrigere Thrombozytenzahlen bei Patienten mit Nachweis von Anti-GP IIb/IIIa- oder Anti-GP Ib/IX-Antikörpern ($38 \text{ G/L} \pm 33 \text{ G/L}$) als bei Patienten ohne ($45 \text{ G/L} \pm 24 \text{ G/L}$) fest [27]. Der Nachweis der Antikörper erfolgte mit dem sogenannten MACE (modified antigen capture ELISA); ob ein signifikanter Unterschied besteht wurde nicht analysiert [27]. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Thrombozytenzahl zwischen Patienten mit und ohne Antikörper gegen GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX in der Studie von Stockelberg et al. (101 ± 120 vs. $136 \pm 133 \text{ G/L}$, $P > 0,05$) [105]. Nur Hou et al. haben einen signifikanten Unterschied der Thrombozytenzahl zwischen Patienten mit und ohne Anti-GP Ib/IX-Antikörper gefunden (93 ± 101 vs. $119 \pm 103 \text{ G/L}$, $P < 0,05$) [37]. In allen vier Studien ist die Patientenkohorte mit $n = 217$ bei Davoren et al., $n = 50$ bei Fabris et al., $n = 65$ bei Stockelberg et al. und $n = 60$ bei Hou et al. deutlich geringer als in dieser Arbeit ($n = 18.579$) [22, 27, 37, 105]. Es wird deutlich, dass sich bisherige Studien zur Relevanz der Antikörper und der Thrombozytenzahl der ITP auf kleine Stichproben von bereits diagnostizierten Patienten beschränken. In dieser Arbeit wird erstmals an einer großen Anzahl von Patienten mit Verdacht auf ITP gezeigt, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Nachweis thrombozytärer Antikörper und der Thrombozytopenie gibt.

Bei 496/2.714 (18,28 %) der Kinder mit der Verdachtsdiagnose ITP finden sich im direkten MAIPA Antikörper gegen GP IIb/IIIa, bei 267/2.183 (12,23 %) gegen GP Ib/IX und bei 205/1.674 (12,25 %) gegen GP V. Bei den Erwachsenen haben 1.382/13.276 (10,41 %) Antikörper gegen GP IIb/IIIa, 1.021/12.346 (8,27 %) gegen GP Ib/IX und 688/10.402 (6,61 %) gegen GP V. Im direkten MAIPA werden pro untersuchte Antikörperspezifität 20 Millionen Patiententhrombozyten benötigt, weswegen insbesondere bei Patienten mit niedrigen Thrombozytenwerten nicht alle drei Glykoproteine getestet werden konnten und die Anzahl der durchgeführten Tests in der Reihenfolge der untersuchten Glykoproteine (1. GPIIb/IIIa, 2. GP Ib/IX, 3. GP V) sinkt (siehe Tabelle 9, Tabelle 10). Dies wird auch dadurch deutlich, dass die Mediane der Thrombozytenzahl in der Reihenfolge der untersuchten Glykoproteinkomplexe ansteigen (GP IIb/IIIa < GP Ib/IX < GP V). In der zuvor genannten Übersichtarbeit von

Porcelijn et al. liegt die Häufigkeit der thrombozytären Antikörper bei ITP-Patienten je nach Studie zwischen 29-90 % [86]. Die analysierten Zielantigene unterscheiden sich (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V, GP Ia/IIa, GP IV); die Stichprobengrößen variieren stark und schwanken zwischen $n = 8-1.140$ [86]. In der umfangreichsten Untersuchung von Vollenberg et al. mit einer Stichprobengröße von $n = 1.140$ weisen 343 (30 %) der Patienten Antikörper gegen die Glykoproteine GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und/oder GP V auf; die drei Antikörperspezifitäten treten dabei in ähnlicher Häufigkeit auf (GP IIb/IIIa: 242 (21 %), GP Ib/IX: 232 (20 %), GP V: 222 (19 %)) [113]. Somit ist der Nachweis von thrombozytären Antikörpern bei Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP in dieser Arbeit geringer als in der Literatur beschrieben. Ein direkter Vergleich ist jedoch nur begrenzt möglich, da in der vorliegenden Arbeit Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP untersucht werden, während in der Literatur meistens Patienten mit bereits diagnostizierter ITP betrachtet werden [86].

In der linearen Regressionsanalyse zeigt der semiquantitative Score bei Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V eine Assoziation mit der Thrombozytenzahl (Kinder: GP IIb/IIIa: $R^2=0,605$ ($r=-0,77$); GP Ib/IX: $R^2=0,5053$ ($r=-0,66$); GP V: $R^2=0,9252$ ($r=-1,00$; Erwachsene: GP IIb/IIIa: $R^2=0,6901$ ($r=-0,83$); GP Ib/IX: $R^2=0,573$ ($r=-0,55$); GP V: $R^2=0,7721$ ($r=-0,83$)). In der Spearman-Korrelationsanalyse ist diese bei Kindern beim GP V ($P=0,0014$), bei Erwachsenen bei GP IIb/IIIa ($P=0,03$) und GP V ($P=0,03$) signifikant. In der Literatur finden sich nur wenige Daten über die potenzielle Bedeutung der Antikörpermenge [93]. Brighton et al. beobachten eine nicht signifikante Tendenz zwischen erhöhter Antikörpermenge und niedrigen Thrombozytenzahlen bei ITP-Patienten, bei McMillan et al. kann diese Korrelation in einer größeren, prospektiven Studie nicht nachgewiesen werden [11, 62]. Eine Korrelation zwischen der Menge gebundener Antikörper und der Thrombozytenzahl, wie in dieser Arbeit beschrieben, ist bisher nicht festgestellt worden [93]. Allerdings ist zu beachten, dass bei der linearen Regressionsanalyse dieser Arbeit lediglich die Mediane der Thrombozytenzahl berücksichtigt wurden. Weitere Studien zu diesem Thema sind erforderlich, um den tatsächlichen Nutzen zu bewerten und die Ergebnisse dieser Arbeit zu bestätigen.

Bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP und positivem Testergebnis im direkten MAIPA zeigt sich kein additiver Effekt der beiden Antikörperspezifitäten GP IIb/IIIa und GP Ib/IX auf die Thrombozytenzahlerniedrigung (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX: $P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test); bei den Erwachsenen besteht ein additiver Effekt bei gleichzeitigem Vorkommen der zwei Antikörperspezifitäten (GP IIb/IIIa: $P = 0,0009$; GP Ib/IX: $P < 0,0001$, Kruskal-Wallis Test) auf die Thrombozytenzahlerniedrigung. Dieser

Effekt besteht nicht bei Vorliegen einer weiteren, dritten Antikörperspezifität gegen GP V ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Al-Samkari et al. haben gezeigt, dass bei Erwachsenen mit zunehmender Anzahl positiver Antikörper die Wahrscheinlichkeit höher ist, einen schwerwiegenden Verlauf der ITP, definiert als Auftreten behandlungsbedürftiger Blutungssymptome, zu entwickeln [1]. Unter der Annahme, dass Blutungen vermehrt bei Patienten mit geringen Thrombozytenzahlen auftreten, entspricht die von Al-Samkari et al. festgestellte Korrelation dem in dieser Arbeit dargelegten additiven Effekt zweier Antikörperspezifitäten (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX) auf die Thrombozytenzahlerniedrigung bei Erwachsenen [1, 48]. Anders als bei Al-Samkari et al. kann in dieser Arbeit der Effekt von drei Antikörperspezifitäten auf die Thrombozytenzahlerniedrigung nicht bestätigt werden. Limitationen der Studie von Al-Samkari et al. sind die von dieser Arbeit abweichenden Antikörperspezifitäten (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa), fehlende Angaben der Thrombozytenzahl der einzelnen Patientengruppen (keine, eine, zwei, drei Antikörperspezifität/en) und fehlende Untersuchungen bei Kindern [1].

In unserer Arbeit gilt der positive Nachweis und die Menge von glykoproteinspezifischen, thrombozytär gebundenen Autoantikörpern gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V als Risikofaktor für eine erniedrigte Thrombozytenzahl bei Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP. Bei Erwachsenen ist das gleichzeitige Vorkommen von Anti-GP IIb/IIIa- und Anti-GP Ib/IX-Antikörpern als Risikofaktor für eine Thrombozytenzahlerniedrigung anzusehen, bei Kindern ist dies nicht der Fall.

4.4 Indirekter MAIPA

In der Literatur besteht Konsens darüber, dass der indirekte MAIPA zur Detektion von freien, glykoproteinspezifischen Autoantikörpern im Rahmen der ITP-Diagnostik nicht empfohlen wird [93]. Der indirekte MAIPA hat eine sehr geringe Sensitivität und ist dem direkten MAIPA unterlegen [116].

4.4.1 Nachweis freier Antikörper gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/IIa

In dieser Arbeit wird die Fragestellung behandelt, inwiefern der Nachweis freier Autoantikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa und die Thrombozytenzahl bei Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP assoziiert sind.

Der Median der Thrombozytenzahl ist bei Patienten mit positivem Nachweis freier Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/IIa im indirekten MAIPA signifikant niedriger als bei Patienten mit fehlendem Nachweis thrombozytärer Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa; dies gilt für Kinder (positiv: 23 G/L (IQR 9-64 G/L), negativ: 31 G/L

(13-76,5 G/L)) und Erwachsene (positiv: 46 G/L (IQR 12-94 G/L), negativ: 64 G/L (20,75-109 G/L)) (Kinder: $P = 0,0055$, Erwachsene: $P < 0,0001$, Mann-Whitney Test). Bei der separaten Betrachtung der einzelnen Glykoproteine ist der Nachweis freier Autoantikörper gegen GP IIb/IIIa und GP Ib/IX bei Kindern und gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa bei Erwachsenen mit einer Thrombozytenzahlerniedrigung assoziiert. Die Unterschiede der Thrombozytenzahl zwischen Patienten mit und ohne Antikörper sind im indirekten MAIPA weniger ausgeprägt als im direkten MAIPA. Auch Grimaldi et al. haben einen signifikanten Unterschied der Thrombozytenzahl zwischen ITP-Patienten mit und ohne freie Antikörper im indirekten MAIPA festgestellt [31]. Patienten mit freien Antikörpern haben eine niedrigere Thrombozytenzahl (3 G/L (IQR 1-13 G/L)) im Vergleich zu Patienten ohne Antikörper (10,5 G/L (IQR 4-29,5 G/L)) ($P = 0,01$, Wilcoxon-Mann-Whitney Test). Die niedrigen Thrombozytenwerte, die unter denen in dieser Arbeit ermittelten Werte liegen, können durch die Einschlusskriterien der Studie von Grimaldi et al. erklärt werden, da nur Patienten mit einem einmalig gemessenen Thrombozytenwert von < 50 G/L eingeschlossen wurden; ferner waren alle Patienten > 15 Jahre alt und die Kohorte vergleichsweise klein ($n = 108$) [31]. Grimaldis und unsere Ergebnisse legen nahe, dass freie Autoantikörper ein Risikofaktor für eine Thrombozytopenie sind, auch wenn ein direkter Vergleich nur begrenzt möglich ist.

Freie Autoantikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa sind bei 332/1.018 (32,61 %) Kindern nachweisbar. 283/1.008 (28,08 %) Kinder haben freie Antikörper gegen GP Ib/IX, 158/1.013 (15,60 %) gegen GP Ia/IIa. Bei den Erwachsenen haben 1.104/3.711 (29,75 %) freie Antikörper gegen GP IIb/IIIa, 836/3.691 (22,65 %) gegen GP Ib/IX und 500/3.702 (13,51 %) gegen GP Ia/IIa. In der Literatur werden selektiv gegen GP IIb/IIIa gerichtete freie Antikörper bei 10,3-48,1 % und selektiv gegen GP Ib/IX gerichtete Antikörper bei 7,7-50,6 % der ITP-Patienten im indirekten MAIPA nachgewiesen [11, 44, 63, 72]. In Untersuchungen zum Vorkommen freier Antikörper bei ITP-Patienten werden Anti-GP Ia/IIa-Antikörper seltener berücksichtigt [86]. He et al. haben bei 6,4 % der ITP-Patienten freie Antikörper gegen GP Ia/IIa nachgewiesen, während Meyer et al. einen höheren Anteil von 36,4 % fanden [34, 64]. Die in dieser Arbeit beobachtete Häufigkeit freier Antikörper gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa entspricht den in der Literatur verbreiteten Angaben.

Zu beachten ist, dass der indirekte MAIPA laut Laborprotokoll nur bei ca. einem Drittel der Patienten (Kinder: ca. 32 %, Erwachsene: ca. 28 %) durchgeführt wurde, weswegen die Prozentzahlen auf die Gesamtkohorte betrachtet niedriger sind. Insgesamt sind bei 507/3.548 (14,29 %) der Kinder und 1.780/15.031 (11,84 %) der

Erwachsenen freie Antikörper gegen mindestens einen der drei untersuchten Glykoproteinkomplexe (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa) nachweisbar. Die in der Literatur angegebene Häufigkeit freier Antikörper bei ITP-Patienten liegt mit 9-25 % im Bereich der in dieser Arbeit ermittelten Werte bei Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP [11, 31, 34, 72]. Einer der Gründe für die geringe Nachweisbarkeit im indirekten MAIPA können niedrigaffine Antikörper sein, wie Vollenberg et al. am Beispiel von freien Anti-GP V-Antikörpern zeigen konnten [113]. Shestra et al. vermuten, dass Antikörper im Knochenmark an Megakaryozyten und Thrombozyten binden und diese zerstören, was zum Fehlen detektierbarer Antikörper im peripheren Blut führt [99].

In der linearen Regressionsanalyse zeigt der semiquantitative Score bei Kindern mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und bei Erwachsenen mit positivem Testergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX eine Assoziation mit der Thrombozytenzahl (Kinder: GP IIb/IIIa: $R^2=0,9792$ ($r=-0,99$); Erwachsene: GP IIb/IIIa: $R^2=0,9422$ ($r=-0,94$); GP Ib/IX: $R^2=0,9506$ ($r=1,00$)). In der Spearman-Korrelationsanalyse ist diese bei Kindern beim GP IIb/IIIa ($P=0,0028$), bei Erwachsenen bei GP IIb/IIIa ($P=0,0167$) und GP Ib/IX ($P=0,0028$) signifikant. Wie bereits beim direkten MAIPA (4.3.2) beschrieben, liegen wenige Studien zum Zusammenhang zwischen Antikörperspiegel und Thrombozytenzahl vor [93]. In den dort genannten Studien von Brighton et al. und McMillan et al. werden freie Antikörper und die Thrombozytenzahl nicht separat untersucht [11, 62]. Erneut ist zu beachten, dass bei der linearen Regressionsanalyse dieser Arbeit lediglich die Mediane der Thrombozytenzahl berücksichtigt wurden. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass eine erhöhte Menge freier Antikörper mit einer niedrigeren Thrombozytenzahl einhergeht.

Bei Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP und positivem Testergebnis im indirekten MAIPA zeigt sich ein additiver Effekt der beiden Antikörperspezifitäten GP IIb/IIIa und GP Ib/IX auf die Thrombozytenzahlerniedrigung (GP IIb/IIIa: $P = 0,0021$; GP Ib/IX: $P = 0,0162$, Kruskal-Wallis Test); bei Kindern besteht dieser nicht (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX: $P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Dieser Effekt besteht nicht bei Vorliegen einer weiteren, dritten Antikörperspezifität gegen GP Ia/IIa ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Unseres Wissens existiert keine Studie, die den Zusammenhang zwischen dem Vorkommen multipler, freier Antikörperspezifitäten und der Thrombozytenzahl bei ITP-Patienten untersucht.

In unserer Arbeit gilt der positive Nachweis, die Menge und die Anzahl von freien Autoantikörpern gegen die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX als Risikofaktor für eine erniedrigte Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP. Bei Kindern gilt der positive Nachweis von freien Anti-

GP IIb/IIIa- und Anti-GP Ib/IX-Antikörpern und die Menge von Anti-GP IIb/IIIa-Antikörpern als Risikofaktor.

4.5 Kombination direkter und indirekter MAIPA

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit ist, ob das gleichzeitige Vorhandensein von freien und gebundenen Thrombozyten-Autoantikörpern ein möglicher Risikofaktor für eine niedrigere Thrombozytenzahl bei Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP ist.

Die Thrombozytenzahl ist bei Patienten mit positivem Nachweis gebundener und freier Antikörper gegen GP IIb/IIIa (Kinder: 30 G/L (IQR 13-56 G/L), Erwachsene: 33 G/L (IQR 15-73 G/L)) oder GP Ib/IX (Kinder: 47 G/L (IQR 23-63 G/L), Erwachsene: 41,5 G/L (IQR 24-77 G/L)) nicht signifikant niedriger als bei Patienten, bei denen nur gebundene Antikörper gegen das jeweilige Glykoprotein nachweisbar sind (GP IIb/IIIa: Kinder: 40 G/L (IQR 23,5-77,5 G/L), Erwachsene: 40 G/L (IQR 17-67,75 G/L); GP Ib/IX: Kinder: 66 G/L (IQR 26-95,5 G/L), Erwachsene: 48,5 G/L (IQR 22-77,75 G/L)) ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Diese Beobachtung gilt gleichermaßen für Kinder und Erwachsene. Obwohl der Nachweis von freien Antikörpern allein als Risikofaktor für eine Thrombozytenzahlerniedrigung gilt, wie oben beschrieben, scheinen die gebundenen Antikörper im Vergleich zu den freien Antikörpern als Risikofaktor für eine niedrige Thrombozytenzahl besonders relevant zu sein. Dies lässt sich durch die Rolle der gebundenen Antikörper in der Pathogenese der ITP erklären. An Thrombozyten gebundene Antikörper führen zu deren vermehrtem Abbau, indem sie die Phagozytose, Apoptose und Zellyse der Thrombozyten induzieren können [58]. Durch gebundene Anti-GP Ib/IX-Antikörper können Thrombozyten desialysiert und in der Leber abgebaut werden [55].

Ein mit der Thrombozytenzahl assoziierter additiver Effekt durch zusätzliche freie Antikörper gegen den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX zeigt sich bei Kindern und Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP nicht.

4.6 Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT)

Ferner haben wir die Assoziation zwischen dem Nachweis von PAIgG im PIFT und der Thrombozytenzahl untersucht. In den Leitlinien ist der PIFT nicht mehr Bestandteil der ITP-Diagnostik, da der Nachweis von PAIgG sowohl bei Patienten mit Thrombozytopenie immunologischer als auch nicht-immunologischer Herkunft gelingt [39, 46, 88]. Der PIFT ist Teil unseres Laborprofils „V.a. ITP“ und wurde bei > 99 % der Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP durchgeführt. Obwohl in unserem Thrombozytenlabor nur der indirekte PIFT durchgeführt wird, kann dies als unmaßgeblich angesehen werden, da von dem Borne et al. gezeigt haben, dass bei

94 % der Thrombozytopenie-Patienten sowohl der direkte als auch der indirekte PIFT positiv sind [115].

Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP und positivem Testergebnis im PIFT haben signifikant niedrigere Thrombozytenzahlen als Patienten mit negativem Testergebnis; dies gilt für Kinder (positiv: 40 G/L (IQR 15-89 G/L), negativ: 58 G/L (23-115 G/L)) und Erwachsene (positiv: 59,5 G/L (IQR 23-105 G/L), negativ: 76 G/L (39-116 G/L)) ($P < 0,0001$, Mann-Whitney Test). Brighton et al. haben eine signifikante negative Korrelation zwischen PAIgG-Nachweis und Thrombozytenzahl gefunden. Eine Unterscheidung zwischen Patienten mit immunologischer und nicht-immunologischer Thrombozytopenie erfolgte nicht, ferner wurde eine andere Nachweismethode verwendet (CELIA) [11]. Bei 24,95 % (821/3.290) der Kinder und 18,26 % (2.584/14.150) der Erwachsenen sind PAIgG nachweisbar. In der Studie von Porcelijn et al. wird bei 55 % der Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP PAIgG nachgewiesen [85]. Laut Joutsu & Kekomäki finden sich bei 53 % der Patienten mit Thrombozytopenie nachweisbare PAIgG; in der Studie hatten jedoch nur 52/234 Patienten die Diagnose ITP (22 %) [40]. Eine Angabe der Thrombozytenzahl bei Patienten mit/ohne PAIgG fehlt in beiden Studien [40, 85]. Die Häufigkeit der positiven Testergebnissen im PIFT ist in dieser Arbeit niedriger als in der Literatur angegeben.

Bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP und positivem Testergebnis im direkten MAIPA zeigt sich kein additiver Effekt auf die Thrombozytenzahlerniedrigung bei zusätzlichem Nachweis von PAIgG im PIFT (pos. DM + pos. PIFT: 39 G/L (IQR 20-71 G/L); pos. DM + neg. PIFT: 40 G/L (IQR 21-82 G/L)) ($P > 0,05$, Kruskal-Wallis Test). Bei Erwachsenen ist ein additiver Effekt zu beobachten (pos. DM + pos. PIFT: 41 G/L (IQR 17-77 G/L); pos. DM + neg. PIFT: 52 G/L (IQR 24-90 G/L)) ($P = 0,0002$, Kruskal-Wallis Test). Entscheidend für die Thrombozytenzahlerniedrigung scheint jedoch das Ergebnis im direkten MAIPA zu sein, da Patienten mit negativem Testergebnis darin unabhängig vom Testergebnis im PIFT höhere Thrombozytenzahlen haben (neg. DM + pos./neg. PIFT: Kinder: 91/99 G/L, Erwachsene: 84/88 G/L). Von den Patienten mit positivem Testergebnis im direkten MAIPA haben nur 31,4 % der Kinder und 28 % der Erwachsenen zusätzlich ein positives Testergebnis im PIFT. In der Literatur wird eine gewisse Korrelation zwischen den Ergebnissen im PIFT und direkten MAIPA beschrieben. Diese Korrelation wird jedoch auf die „echten“ GP-PAIgG zurückgeführt, die im PIFT zusammen mit anderen an die Thrombozytenmembran gebundenen Immunglobulinen nachgewiesen werden [93]. Auch bei der in dieser Arbeit gefundenen Assoziation zwischen positivem direkten

MAIPA und PIFT bei Erwachsenen können die ‚echten‘ GP-PAIgG im PIFT für die Thrombozytenzahlerniedrigung verantwortlich sein.

Bei Kindern und Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP gilt der Nachweis von PAIgG im PIFT als Risikofaktor für eine erniedrigte Thrombozytenzahl. Verantwortlich hierfür könnten die ‚echten‘ GP-PAIgG sein, die ebenfalls im PIFT nachgewiesen wurden, wie der Vergleich von direkter MAIPA und PIFT zeigt.

4.7 Sensitivität & Spezifität

Die Sensitivität der direkten Nachweisverfahren für thrombozytäre Antikörper variiert in der Literatur stark, mit Werten zwischen 19 % und 92 %. Die Spezifität liegt im Bereich von 76 % bis 100 % [46, 86, 93, 95]. Metaanalysen und systematische Übersichtsarbeiten verdeutlichen, dass Studien zu diesem Thema aufgrund einer Heterogenität der Stichproben (Größe, Kontrollgruppe), Labormethoden (direkte/indirekte Testverfahren, verwendete Thrombozytenzahl), Nachweisgrenzen im Labor (OD-Werte) und Zielantigene (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V) eingeschränkt sind [1, 86, 116].

Da bei unserer Patientenkohorte nur der Verdacht auf eine ITP besteht, haben wir als Diskriminierungswert eine Thrombozytenzahl ≤ 100 G/L angenommen, da eine ITP definitionsgemäß bei einer Thrombozytenzahl < 100 G/L vorliegt [91]. In dieser Arbeit errechnen sich folgende Spezifitäten bei Kindern/Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP und Nachweis thrombozytärer Antikörper im direkten MAIPA: GP IIb/IIIa = 91 %/95 %, GP Ib/IX = 93 %/96 %, GP V = 93 %/96 %. Die Sensitivität der Kinder/Erwachsenen liegt bei: GP IIb/IIIa = 23 %/14 %, GP Ib/IX = 16 %/11 %, GP V = 16 %/8 %. Eine Metaanalyse von Vrbensky et al., die insgesamt 18 Studien zur Sensitivität und Spezifität von Autoantikörpern gegen GP IIb/IIIa und/oder GP Ib/IX umfasst, ergibt bei einer gewichteten Durchschnittsberechnung der direkten Nachweismethoden eine Spezifität/Sensitivität von 92 %/48 % für GP IIb/IIIa und 98 %/37 % für GP Ib/IX [116]. Die Angaben der Spezifität in dieser Arbeit stimmen mit den hohen Werten in der Literatur überein; die Sensitivität hingegen liegt unter denen von Vrbensky et al. ermittelten [116]. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass bei den hier untersuchten Patienten die Verdachtsdiagnose ITP besteht; die Studien zur Ermittlung der Sensitivität jedoch meist an Patienten mit der bereits gestellten Diagnose ITP durchgeführt werden [1, 93].

In der Metaanalyse von Vrbensky et al. wird auch der indirekte Nachweis von Autoantikörpern bei ITP-Patienten beachtet und ergibt eine Sensitivität von 24 % beim GP IIb/IIIa und 8 % beim GP Ib/IX, sowie eine Spezifität von 96 % für beide Glykoproteine [116]. In dieser Arbeit errechnen sich folgende Spezifitäten bei

Kindern/Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP und Nachweis freier Autoantikörper im indirekten MAIPA: GP IIb/IIIa = 73 %/77 %, GP Ib/IX = 77 %/84 %, GP Ia/IIa = 84 %/89 %. Die Sensitivität der Kinder/Erwachsenen liegt bei: GP IIb/IIIa = 34 %/32 %, GP Ib/IX = 29 %/25 %, GP Ia/IIa = 16 %/14%. Die Werte der Spezifität dieser Arbeit sind somit niedriger und die der Sensitivität höher als die von Vrbensky et al. ermittelten [116].

Beim Nachweis von PAIgG errechnen sich folgende Werte der Spezifität/Sensitivität bei Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP: Kinder = 81 %/27 %, Erwachsene = 85 %/ 20 %. Brighton et al. haben ähnliche Werte beim Nachweis von PAIgG bei Patienten mit Thrombozytopenie ermittelt: Spezifität (26 %) und Sensitivität (74 %) [11]. Zu beachten ist, dass bei Brighton et al. lediglich 63 % der Patienten die Thrombozytopenie auf eine ITP zurückzuführen war [11].

Die in dieser Arbeit ermittelten Werte sind aufgrund fehlender Patientenangaben nur begrenzt interpretierbar. Es fehlen beispielsweise Informationen zum Behandlungsstatus und zur Erkrankungsdauer, sowie zur abschließenden Diagnosestellung. Es bedarf weiterer Untersuchungen bei Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP, die noch keine Therapie erhalten haben und bei denen die Suche nach Antikörpern im Rahmen der Erstdiagnostik durchgeführt wird.

4.8 Bedeutung für die Klinik

Diese Arbeit zeigt eine Assoziation zwischen dem Nachweis von thrombozytären Autoantikörpern und dem Schweregrad der Thrombozytopenie bei Patienten mit Verdacht auf ITP. Diese kann in verschiedenen Bereichen des klinischen Alltags der ITP nützlich sein.

Die Diagnosestellung der ITP und der Nachweis thrombozytärer Autoantikörper als ein Bestandteil der Diagnostik werden international kontrovers diskutiert [86]. Trotz der allgemein anerkannten Bedeutung der thrombozytären Antikörper bei der Entstehung der ITP, ist die ITP eine klinische Diagnose, die nach dem Ausschluss anderer Ursachen gestellt wird [86, 93]. Obwohl es bei anderen Autoimmunerkrankung üblich ist, die Diagnose mittels Nachweis spezifischer Autoantikörper zu stellen, wird die Antikörperdiagnostik in den Leitlinien zur ITP entweder nicht empfohlen oder nicht erwähnt [93]. In der ersten bekannten Leitlinie der „American Society of Hematology“ 1996 heißt es, dass die Suche nach thrombozytären Autoantikörpern nicht erforderlich sei [30]. In den Aktualisierungen der ASH-Leitlinie (2011, 2019) wird die Antikörperdiagnostik nicht erneut thematisiert [75, 76]. In der deutschen Leitlinie und der ICR-Leitlinie („International Consensus Report“) bleibt der Nachweis thrombozytärer Antikörper komplexen Fällen vorbehalten und wird nicht routinemäßig

empfohlen [59, 88]. Auch die britischen und koreanischen Leitlinien empfehlen die Testung nicht [12, 39]. Im Gegensatz dazu gibt es eine zunehmende Anzahl von Autoren, die die Diagnosestellung der ITP durch den Nachweis thrombozytärer Antikörper unterstützen und deren Nachweis als Teil der Erstdiagnostik fordern [1, 85, 93, 102]. Die Meinung der Autoren wird durch unsere Ergebnisse bestärkt, da Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP und positivem Nachweis thrombozytärer Antikörper Thrombozytenzahlen < 100 G/L haben, was mit der Definition der ITP übereinstimmt [59]. Es gibt Hinweise darauf, dass am Anfang der Erkrankung höhere Antikörperspiegel vorliegen, was eine frühe Antikörperdiagnostik als sinnvoll erscheinen lässt [120]. Zusätzlich kann durch den Einsatz der Antikörperdiagnostik die Häufigkeit von Fehldiagnosen, die in der Literatur bei 14 % der Kinder und 12,2 % der Erwachsenen beschrieben wird, reduziert werden [86]. Fehldiagnostizierte Patienten sind nicht nur einer ungeeigneten Behandlung ausgesetzt, sondern auch mit den damit verbundenen Nebenwirkungen, Kosten und einer verzögerten Diagnosefindung der tatsächlichen Erkrankung [95].

Die geringe Bedeutung der Labormethoden zur Identifizierung glykoproteinspezifischer, thrombozytärer Autoantikörper bei der Diagnose der ITP resultiert aus der Tatsache, dass diese Verfahren eine hohe Spezifität aufweisen, jedoch eine niedrige Sensitivität besitzen [2]. In dieser Arbeit haben wir ebenfalls hohe Werte der Spezifität und niedrige Werte der Sensitivität gefunden, wie weiter oben beschrieben, auch wenn diese nur eingeschränkt beurteilbar sind. Es sind umfassende Kohortenstudien mit klar definierten ITP-Patienten und Verdachtsfällen erforderlich, um eine weitere Standardisierung und Optimierung der direkten Autoantikörper-Nachweisverfahren zu erreichen und die Sensitivität ohne Beeinträchtigung der Spezifität zu erhöhen [7, 86]. Ein Beispiel hierfür ist die Studie von Porcelijn et al., bei der bei 165 ITP-Verdachtspatienten eine Sensitivität von 78 % und eine Spezifität von 96 % erreicht wurden [85].

Die Testung auf thrombozytäre Autoantikörper kann für ITP-Patienten klinisch relevant sein, da der Nachweis solcher Antikörper mit einem erhöhten Risiko für Thrombosen und Blutungen, der Entwicklung einer chronischen Erkrankung sowie einem schlechteren klinischen Outcome verbunden ist [19, 27, 31, 53]. Daher ist es sinnvoll, frühzeitig nach diesen Antikörpern zu suchen.

Mehrere Studien haben den Zusammenhang zwischen Antikörperspezifität und Therapieansprechen bei ITP-Patienten untersucht. Während Peng et al. bei Patienten mit Anti-GP Ib/IX-Antikörpern ein schlechteres Ansprechen auf IVIG und Zeng et al. auf Steroide festgestellt haben, konnten Al-Samkari et al. keinen Zusammenhang

nachweisen [1, 81, 119]. Porcelijn et al. haben gezeigt, dass die Abwesenheit von Antikörpern mit einer Resistenz gegenüber Rituximab assoziiert ist [84]. Eine klinische Remission ist mit dem Verschwinden der Antikörper verbunden, wie Al-Samkari et al. bei 10 ITP-Patienten festgestellt haben [1]. Ein negatives Testergebnis erhöht die Wahrscheinlichkeit einer klinischen Remission um 40-45 % [1]. Bei langjährig behandelten Patienten mit stabilen Thrombozytenwerten kann ein negativer Antikörper-Nachweis die Entscheidung für eine Therapiepause unterstützen [1]. Obwohl dieser Bereich noch umstritten ist, könnte der Nutzen des Nachweises von Autoantikörpern bei ITP-Patienten nicht nur bei der Diagnosestellung, sondern auch bei der Therapieentscheidung und einer personalisierten Medizin hilfreich sein [85, 93].

Die Ergebnisse der vorliegenden Literatur belegen die Relevanz von Antikörpern in verschiedenen Bereichen des klinischen Alltags von ITP-Patienten. Unsere eigenen Ergebnisse unterstützen diese Ansicht und unterstreichen die Bedeutung einer frühen Antikörperdiagnostik bei ITP-Patienten. In vielen Bereichen werden große Studien an charakterisierten Patienten benötigt, um die Ergebnisse und deren klinischen Nutzen weiter zu evaluieren und zu bestätigen.

4.9 Schwächen der Arbeit

Das Besondere dieser Arbeit, die große Stichprobengröße von 18.579 ITP-Verdachtspatienten, weist gleichzeitig einige Schwächen auf. Zum einen ist unklar, ob die Patienten bereits Therapien erhalten haben oder nicht, was die Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigt, da gezeigt werden konnte, dass Antikörper bei bestimmten Therapien verschwinden [1]. Es fehlen Informationen zur Erkrankungsdauer und -stadium, die für die Interpretation der Ergebnisse relevant wären, da Studien gezeigt haben, dass Patienten später im Verlauf der Erkrankung niedrigere Antikörperlevel haben [95].

Die Durchführung des direkten MAIPA war bei einigen Patienten aufgrund einer zu niedrigen Thrombozytenzahl nicht möglich [108]. In unserem Thrombozytenlabor werden im direkten MAIPA nur die drei Glykoprotein GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V und im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa getestet [108, 109]. Weitere relevante Zielantigene können theoretisch übersehen worden sein [93]. Die Bindung des Autoantikörpers und des monoklonalen Antikörpers an dasselbe Zielantigen beim MAIPA könnte zu einer sterischen Hinderung führen, obwohl Experten dies als unwahrscheinlich betrachten [93]. Im Labor werden nur IgG-Antikörper, ohne Charakterisierung der Unterklassen, getestet. Nach IgA- und IgM-Antikörpern wurde nicht gesucht. Deren Nachweis ist jedoch sehr selten und es konnte nicht nachgewiesen werden, dass Antikörper vom Typ IgA oder IgM eine ähnliche

Fähigkeit wie IgG-Antikörper haben, Thrombozyten zu zerstören [93]. Selten können bei Lymphomen oder myelodysplastischen Syndromen falsch-positiven Ergebnisse auftreten [59].

Es besteht die Möglichkeit, dass bei Patienten ohne nachweisbare Antikörper andere Faktoren wie zytotoxische T-Zellen oder Störungen der Thrombozytopenie die Thrombozytopenie verursachen [102].

5. Zusammenfassung

Die Immunthrombozytopenie (ITP) ist eine Autoimmunerkrankung, bei der verschiedene Mechanismen beschrieben wurden, die zu einer gesteigerten Thrombozytenelimination mit konsekutiver Blutungsneigung führen. Die Bedeutung des Nachweises von Autoantikörpern gegen thrombozytäre Glykoproteine für die Diagnose der ITP ist umstritten. Internationale Leitlinien empfehlen eine Ausschlussdiagnose der ITP. Autoantikörper könnten bei einem Teil der Patienten als Epiphänomen ohne kausale Beziehung zum Ausmaß der Thrombozytopenie auftreten. Frühere Studien könnten durch die Zusammensetzung der Stichprobe verfälscht worden sein, da größtenteils Patienten mit der Ausschlussdiagnose ITP untersucht wurden. In dieser Arbeit soll der mögliche Zusammenhang zwischen Antikörpernachweis im direkten MAIPA (DM), ferner im indirekten (IM), und der Thrombozytenzahl bei nicht-selektierten Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP untersucht werden. Daten von 18.579 ITP-Verdachtspatienten (3.548 Kinder, 15.031 Erwachsene), die das Laborprofil „V.a. ITP“ erhielten, wurden ausgewertet. Bei 573 (16,2%) Kindern und 1.859 (12,4%) Erwachsenen konnte mindestens ein glykoproteinspezifischer thrombozytär gebundener Autoantikörper gegen GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V im DM nachgewiesen werden. In der pädiatrischen Gruppe lag der Median der Thrombozytenzahl mit 39 G/L (IQR 20-79) bei DM-positiven signifikant niedriger als bei DM-negativen (98 G/L (58-154)) ($P < 0,0001$); ebenso bei den Erwachsenen mit 48 G/L (21-86) bei DM-positiven und 88 G/L (55-124) bei DM-negativen ($P < 0,0001$). Die Menge der gebundenen Antikörper korrelierte bei Kindern (GP IIb/IIIa: $R^2=0,605$ ($r=-0,77$); GP Ib/IX: $R^2=0,5053$ ($r=-0,66$); GP V: $R^2=0,9252$ ($r=-1,00$)) und Erwachsenen (GP IIb/IIIa: $R^2=0,6901$ ($r=-0,83$); GP Ib/IX: $R^2=0,573$ ($r=-0,55$); GP V: $R^2=0,7721$ ($r=-0,83$)) mit der Thrombozytenzahl. Freie Autoantikörper gegen mindestens ein Glykoprotein (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/IIa) wurden bei 507 (14,29%) Kindern und 1.780 (11,84%) Erwachsenen nachgewiesen. Der Median der Thrombozytenzahl lag bei IM-positiven Kindern mit 23 G/L (9-64) signifikant niedriger als bei IM-negativen (31 G/L (13-76,5)) ($P = 0,0055$); ebenso bei IM-positiven Erwachsenen mit 46 G/L (12-94) und 64 G/L (20,75-109) bei IM-negativen ($P < 0,0001$). Die Menge der freien Antikörper war bei Kindern (GP IIb/IIIa: $R^2=0,9792$ ($r=-0,99$)) und Erwachsenen (GP IIb/IIIa: $R^2=0,9422$ ($r=-0,94$), GP Ib/IX: $R^2=0,9506$ ($r=-1,00$)) mit der Thrombozytenzahl assoziiert. Der Nachweis von mehr als einer Antikörperspezifität (Anti-GP IIb/IIIa und Anti-GP Ib/IX) im DM oder IM war bei Erwachsenen mit signifikant niedrigeren Thrombozytenwerten verbunden (DM: GP IIb/IIIa: $P=0,0009$; GP Ib/IX: $P < 0,0001$; IM: GP IIb/IIIa: $P=0,0021$; GP Ib/IX: $P=0,0162$); bei Kindern nicht (DM, IM: $P > 0,05$). Das gleichzeitige Vorkommen von gebundenen und freien Antikörpern gegen GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX

war nicht mit der Thrombozytenzahl assoziiert ($P > 0,05$). Zusammenfassend gesagt, ist der Nachweis und die Menge von gebundenen oder freien Antikörpern mit dem Schweregrad einer Thrombozytopenie assoziiert. Der direkte (indirekte) MAIPA stellt eine diagnostisch nützliche Methode dar, um die Diagnose ITP zu sichern. Weitere Studien an definierten Patientengruppen sind erforderlich, um die diagnostische Sensitivität und Spezifität zu bestimmen.

6. Summary

Immune thrombocytopenia (ITP) is an autoimmune disease where various mechanisms have been described that lead to increased platelet elimination with consecutive bleeding tendency. The importance of detecting autoantibodies targeted against platelet glycoproteins for the diagnosis of ITP is controversial. International guidelines recommend a diagnosis by exclusion. In some patients, autoantibodies could occur as an epiphenomenon with no causal relationship to the extent of thrombocytopenia. Previous studies might have been biased by sample composition, as most patients studied had an exclusion diagnosis of ITP. In this work, the possible association between antibody detection in direct MAIPA (DM), further in indirect (IM), and platelet count in non-selected patients with the suspected diagnosis of ITP was investigated. Datasets from 18,579 patients with suspected ITP (3,548 children, 15,031 adults) who received the laboratory profile "suspected ITP" were analyzed. In 573 (16.2%) children and 1,859 (12.4%) adults, at least one glycoprotein-specific platelet-bound autoantibody against GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, or GP V could be detected in DM. In the paediatric group, the median platelet count was significantly lower for DM-positive (39 G/L (IQR 20-79)) than for DM-negative (98 G/L (58-154)) patients ($p < 0.0001$); likewise for adults with 48 G/L (21-86) for DM-positive and 88 G/L (55-124) for DM-negative patients ($p < 0.0001$). The level of bound antibodies correlated well with the platelet count, both in children (GP IIb/IIIa: $R^2 = 0.605$ ($r = -0.77$); GP Ib/IX: $R^2 = 0.5053$ ($r = -0.66$); GP V: $R^2 = 0.9252$ ($r = 1.00$)) and adults (GP IIb/IIIa: $R^2 = 0.6901$ ($r = -0.83$); GP Ib/IX: $R^2 = 0.573$ ($r = -0.55$); GP V: $R^2 = 0.7721$ ($r = 0.83$)). Free auto-antibodies directed against at least one glycoprotein (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, or GP Ia/IIa) were found in 507 (14.29%) children and 1,780 (11.84%) adults. The median platelet count was significantly lower for IM-positive children (23 G/L (9-64)) than for IM-negative (31 G/L (13-76.5)) ($p = 0.0055$); likewise for adults with 46 G/L (12-94) for IM-positive and 64 G/L (20.75-109) for IM-negative ($p < 0.0001$). The level of free antibodies was associated with the platelet count in children (GP IIb/IIIa: $R^2 = 0.9792$ ($r = -0.99$)) and adults (GP IIb/IIIa: $R^2 = 0.9422$ ($r = -0.94$), GP Ib/IX: $R^2 = 0.9506$ ($r = -1.00$)). Detection of more than one antibody entity (anti-GP IIb/IIIa and anti-GP Ib/IX) in DM or IM was associated with significantly lower platelet counts in adults (DM: GP IIb/IIIa: $P = 0.0009$;

GP Ib/IX: $P < 0.0001$; IM: GP IIb/IIIa: $P = 0.0021$; GP Ib/IX: $P = 0.0162$); not in children (DM, IM: $P > 0.05$). The co-occurrence of bound and free antibodies to GP IIb/IIIa or GP Ib/IX was not linked with lower platelet counts ($p > 0.05$). In summary, the detection and the level of bound or free autoantibodies could be associated with the severity of thrombocytopenia. The direct (indirect) MAIPA represents a diagnostically useful method to confirm the diagnosis of ITP. Further studies in defined patient groups are needed to determine diagnostic sensitivity and specificity.

7. Literaturverzeichnis

1. Al-Samkari H, Rosovsky RP, Karp Leaf RS, Smith DB, Goodarzi K, Fogerty AE, Sykes DB, Kuter DJ (2020) A modern reassessment of glycoprotein-specific direct platelet autoantibody testing in immune thrombocytopenia. *Blood Adv* 4(1):9–18. doi:10.1182/bloodadvances.2019000868
2. Althaus K, Faul C, Bakchoul T (2021) New Developments in the Pathophysiology and Management of Primary Immune Thrombocytopenia. *Hamostaseologie* 41(4):275–282. doi:10.1055/a-1311-8264
3. Andrews RK, Shen Y, Gardiner EE, Dong JF, López JA, Berndt MC (1999) The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. *Thromb Haemost* 82(2):357–364
4. Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC (2003) Glycoprotein Ib-IX-V. *Int J Biochem Cell Biol* 35(8):1170–1174. doi:10.1016/s1357-2725(02)00280-7
5. Andrews RK, Berndt MC (2008) Platelet adhesion: a game of catch and release. *J Clin Invest* 118(9):3009–3011. doi:10.1172/JCI36883
6. Andrews RK, Berndt MC (2013) Chapter 10 - The GPIb-IX-V Complex. *Platelets* 12:195–213. doi:10.1016/B978-0-12-387837-3.00010-9
7. Arnold DM, Santoso S, Greinacher A, Platelet Immunology Scientific Subcommittee of the ISTH (2012) Recommendations for the implementation of platelet autoantibody testing in clinical trials of immune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 10(4):695–697. doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04664.x
8. Audia S, Mahévas M, Samson M, Godeau B, Bonnotte B (2017) Pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Autoimmun Rev* 16(6):620–632. doi:10.1016/j.autrev.2017.04.012
9. Beck CE, Nathan PC, Parkin PC, Blanchette VS, Macarthur C (2005) Corticosteroids versus intravenous immune globulin for the treatment of acute immune thrombocytopenic purpura in children: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Pediatr* 147(4):521–527. doi:10.1016/j.jpeds.2005.04.032
10. Bledzka K, Pesho MM, Ma Y-Q, Plow EF (2013) Chapter 12 - Integrin α IIb β 3. *Platelets* 12:233–248. doi:10.1016/B978-0-12-387837-3.00012-2
11. Brighton TA, Evans S, Castaldi PA, Chesterman CN, Chong BH (1996) Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigen-specific assay (MAIPA) in idiopathic thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias. *Blood* 88(1):194–201

12. British Committee for Standards in Haematology General Haematology Task Force (2003) Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy. *Br J Haematol* 120(4):574–596. doi:10.1046/j.1365-2141.2003.04131.x
13. Bruin M, Bierings M, Uiterwaal C, Révész T, Bode L, Wiesman ME, Kuijpers T, Tamminga R, de Haas M (2004) Platelet count, previous infection and FCGR2B genotype predict development of chronic disease in newly diagnosed idiopathic thrombocytopenia in childhood: results of a prospective study. *Br J Haematol* 127(5):561–567. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05235.x
14. Bryckaert M, Rosa JP, Denis CV, Lenting PJ (2015) Of von Willebrand factor and platelets. *Cell Mol Life Sci* 72(2):307–326. doi:10.1007/s00018-014-1743-8
15. Cines DB, Blanchette VS (2002) Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 346(13):995–1008. doi:10.1056/NEJMra010501
16. Cines DB, Bussel JB, Liebman HA, Luning Prak ET (2009) The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood* 113(26):6511–6521. doi:10.1182/blood-2009-01-129155
17. Clemetson KJ, Clemetson JM (1995) Platelet GPIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *Semin Thromb Hemost* 21(2):130–136. doi:10.1055/s-2007-1000387
18. Clemetson KJ, Clemetson JM (2013) Chapter 9 - Platelet Receptors. *Platelets* 12:169–194. doi:10.1016/B978-0-12-387837-3.00009-2
19. Cooper N (2017) State of the art - how I manage immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 177(1):39–54. doi:10.1111/bjh.14515
20. Cooper N, Ghanima W (2019) Immune Thrombocytopenia. *N Engl J Med* 381(10):945–955. doi:10.1056/NEJMcp1810479
21. Cramer EM, Savidge GF, Vainchenker W, Berndt MC, Pidard D, Caen JP, Massé JM, Breton-Gorius J (1990) Alpha-granule pool of glycoprotein IIb-IIIa in normal and pathologic platelets and megakaryocytes. *Blood* 75(6):1220–1227
22. Davoren A, Bussel J, Curtis BR, Moghaddam M, Aster RH, McFarland JG (2005) Prospective evaluation of a new platelet glycoprotein (GP)-specific assay (PakAuto) in the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia (AITP). *Am J Hematol* 78(3):193–197. doi:10.1002/ajh.20309
23. Dohrn R (1874) Ein Fall von Morbus maculosus Werlhofii übertragen von der Mutter auf die Frucht. *Arch. Gynak.* 6(3):486–487. doi:10.1007/BF02001246
24. Duperray A, Berthier R, Chagnon E, Ryckewaert JJ, Ginsberg M, Plow E, Marguerie G (1987) Biosynthesis and processing of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes. *J Cell Biol* 104(6):1665–1673. doi:10.1083/jcb.104.6.1665

25. Eberl W, Holzhauser S, Bergmann F, Cario H, Dame C, Dickerhoff R, Klarmann D, Knöfler R, Kühne T, Matzdorff A, Sachs U, Schulz A, Wermes C (2018) Sk2-Leitlinie 086-001: Neu diagnostizierte Immuntrombozytopenie im Kindes- und Jugendalter. URL: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/086-001.html>. Zugegriffen: 15. April 2021
26. Ekstrand C, Linder M, Baricault B, Lafaurie M, Sailler L, Lapeyre-Mestre M, Kieler H, Moulis G, Bahmanyar S (2019) Impact of risk factors on the occurrence of arterial thrombosis and venous thromboembolism in adults with primary immune thrombocytopenia - Results from two nationwide cohorts. *Thromb Res* 178:124–131. doi:10.1016/j.thromres.2019.04.016
27. Fabris F, Scandellari R, Ruzzon E, Randi ML, Luzzatto G, Girolami A (2004) Platelet-associated autoantibodies as detected by a solid-phase modified antigen capture ELISA test (MACE) are a useful prognostic factor in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 103(12):4562–4564. doi:10.1182/blood-2003-09-3352
28. Flores A, Buchanan GR (2016) Occult hemorrhage in children with severe ITP. *Am J Hematol* 91(3):287–290. doi:10.1002/ajh.24264
29. Frederiksen H, Schmidt K (1999) The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age. *Blood* 94(3):909–913
30. George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Ballem PJ, Blanchette VS, Bussel JB, Cines DB, Kelton JG, Lichtin AE, McMillan R, Okerbloom JA, Regan DH, Warrier I (1996) Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 88(1):3–40
31. Grimaldi D, Canouï-Poitrine F, Croisille L, Lee K, Roudot-Thoraval F, Languille L, Khellaf M, Michel M, Godeau B, Bierling P (2014) Antiplatelet antibodies detected by the MAIPA assay in newly diagnosed immune thrombocytopenia are associated with chronic outcome and higher risk of bleeding. *Ann Hematol* 93(2):309–315. doi:10.1007/s00277-013-1855-5
32. Hamidi H, Pietilä M, Ivaska J (2016) The complexity of integrins in cancer and new scopes for therapeutic targeting. *Br J Cancer* 115(9):1017–1023. doi:10.1038/bjc.2016.312
33. Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV (1951) Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med* 38(1):1–10
34. He R, Reid DM, Jones CE, Shulman NR (1994) Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic

- thrombocytopenic purpura. *Blood* 83(4):1024–1032.
doi:10.1182/blood.V83.4.1024.1024
35. Heitink-Pollé KMJ, Nijsten J, Boonacker CW, de Haas M, Bruin MCA (2014) Clinical and laboratory predictors of chronic immune thrombocytopenia in children: a systematic review and meta-analysis. *Blood* 124(22):3295–3307.
doi:10.1182/blood-2014-04-570127
 36. Hoffmeister KM (2020) The never-ending enigma of immune thrombocytopenia. *Blood* 135(25):2207–2209. doi:10.1182/blood.2020005555
 37. Hou M, Stockelberg D, Kutti J, Wadenvik H (1995) Antibodies against platelet GPIIb/IX, GPIIb/IIIa, and other platelet antigens in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 55(5):307–314. doi:10.1111/j.1600-0609.1995.tb00702.x
 38. Iino M, Sakamoto Y, Sato T (2020) Treatment-free remission after thrombopoietin receptor agonist discontinuation in patients with newly diagnosed immune thrombocytopenia: an observational retrospective analysis in real-world clinical practice. *Int J Hematol* 112(2):159–168. doi:10.1007/s12185-020-02893-y
 39. Jang JH, Kim JY, Mun YC, Bang SM, Lim YJ, Shin DY, Choi YB, Yhim HY, Lee JW, Kook H (2017) Management of immune thrombocytopenia: Korean experts recommendation in 2017. *Blood Res* 52(4):254–263. doi:10.5045/br.2017.52.4.254
 40. Joutsu L, Kekomäki R (1997) Comparison of the direct platelet immunofluorescence test (direct PIFT) with a modified direct monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (direct MAIPA) in detection of platelet-associated IgG. *Br J Haematol* 96(1):204–209. doi:10.1046/j.1365-2141.1997.d01-1995.x
 41. Kelton JG, Vrbensky JR, Arnold DM (2018) How do we diagnose immune thrombocytopenia in 2018? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2018(1):561–567. doi:10.1182/asheducation-2018.1.561
 42. Kiefel V (2014) Immunthrombozytopenie: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie. *Transfusionsmedizin - Immunhämatologie, Hämotherapie, Immungenetik, Zelltherapie* 4(2):88–102. doi:10.1055/s-0033-1357912
 43. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Müller-Eckhardt C (1987) Monoclonal antibody--specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood* 70(6):1722–1726
 44. Kiefel V, Santoso S, Kaufmann E, Müller-Eckhardt C (1991) Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib/IX: a frequent finding in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 79(2):256–262. doi:10.1111/j.1365-2141.1991.tb04530.x

45. Kiefel V, Freitag E, Kroll H, Santoso S, Mueller-Eckhardt C (1996) Platelet autoantibodies (IgG, IgM, IgA) against glycoproteins IIb/IIIa and Ib/IX in patients with thrombocytopenia. *Ann Hematol* 72(4):280–285. doi:10.1007/s002770050173
46. Kiefel V (2020) Platelet antibodies in immune thrombocytopenia and related conditions. *J Lab Med* 44(5):273–284. doi:10.1515/labmed-2020-0012
47. Kobe B, Kajava AV (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11(6):725–732. doi:10.1016/s0959-440x(01)00266-4
48. Kohli R, Chaturvedi S (2019) Epidemiology and Clinical Manifestations of Immune Thrombocytopenia. *Hamostaseologie* 39(3):238–249. doi:10.1055/s-0039-1683416
49. Koylu A, Pamuk GE, Uyanik MS, Demir M, Pamuk ON (2015) Immune thrombocytopenia: epidemiological and clinical features of 216 patients in northwestern Turkey. *Ann Hematol* 94(3):459–466. doi:10.1007/s00277-014-2220-z
50. Kühne T, Berchtold W, Michaels LA, Wu R, Donato H, Espina B, Tamary H, Rodeghiero F, Chitlur M, Rischewski J, Imbach P (2011) Newly diagnosed immune thrombocytopenia in children and adults: a comparative prospective observational registry of the Intercontinental Cooperative Immune Thrombocytopenia Study Group. *Haematologica* 96(12):1831–1837. doi:10.3324/haematol.2011.050799
51. Kuwana M, Okazaki Y, Kajihara M, Kaburaki J, Miyazaki H, Kawakami Y, Ikeda Y (2002) Autoantibody to c-Mpl (thrombopoietin receptor) in systemic lupus erythematosus: relationship to thrombocytopenia with megakaryocytic hypoplasia. *Arthritis Rheum* 46(8):2148–2159. doi:10.1002/art.10420
52. Kuwana M, Okazaki Y, Satoh T, Asahi A, Kajihara M, Ikeda Y (2005) Initial laboratory findings useful for predicting the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Med* 118(9):1026–1033. doi:10.1016/j.amjmed.2004.12.027
53. Lambert MP, Gernsheimer TB (2017) Clinical updates in adult immune thrombocytopenia. *Blood* 129(21):2829–2835. doi:10.1182/blood-2017-03-754119
54. Lee EJ, Beltrami-Moreira M, Al-Samkari H, Cuker A, DiRaimo J, Gernsheimer T, Kruse A, Kessler C, Kruse C, Leavitt AD, Lee AI, Liebman HA, Newland AC, Ray AE, Tarantino MD, Thachil J, Kuter DJ, Cines DB, Bussel JB (2022) SARS-CoV-2 Vaccination and Immune Thrombocytopenia in de novo and pre-existing ITP patients. *Blood* 139(10):1564–1574. doi:10.1182/blood.2021013411
55. Li J, van der Wal DE, Zhu G, Xu M, Yougbare I, Ma L, Vadasz B, Carrim N, Grozovsky R, Ruan M, Zhu L, Zeng Q, Tao L, Zhai ZM, Peng J, Hou M, Leytin V, Freedman J, Hoffmeister KM, Ni H (2015) Desialylation is a mechanism of Fc-

- independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nat Commun* 6:7737. doi:10.1038/ncomms8737
56. López JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC (1998) Bernard-Soulier Syndrome. *Blood* 91(12):4397–4418. doi:10.1182/blood.V91.12.4397
 57. Ma D, Zhu X, Zhao P, Zhao C, Li X, Zhu Y, Li L, Sun J, Peng J, Ji C, Hou M (2008) Profile of Th17 cytokines (IL-17, TGF-beta, IL-6) and Th1 cytokine (IFN-gamma) in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol* 87(11):899–904. doi:10.1007/s00277-008-0535-3
 58. Marini I, Bakchoul T (2019) Pathophysiology of Autoimmune Thrombocytopenia: Current Insight with a Focus on Thrombopoiesis. *Hamostaseologie* 39(3):227–237. doi:10.1055/s-0039-1678732
 59. Matzdorff A, Holzhauser S, Kühne T, Meyer O, Ostermann H, Pabinger-Fasching I, Rummel MJ, Sachs U, Wörmann B (2020) Immunthrombozytopenie (ITP). Leitlinie, Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen. URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/immunthrombozytopenie-itp/@@guideline/html/index.html>. Zugegriffen: 05. April 2023
 60. Maucher IV (2020) Fostamatinib - Anwendung, Wirkung, Nebenwirkungen. Gelbe Liste. URL: https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Fostamatinib_56157. Zugegriffen: 04. April 2021
 61. McMillan R, Tani P, Millard F, Berchtold P, Renshaw L, Woods VL, Jr (1987) Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood* 70(4):1040–1045
 62. McMillan R, Wang L, Tani P (2003) Prospective evaluation of the immunobead assay for the diagnosis of adult chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP). *J Thromb Haemost* 1(3):485–491. doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00091.x
 63. Meyer O, Agaylan A, Bombard S, Kiesewetter H, Salama A (2006) A novel antigen-specific capture assay for the detection of platelet antibodies and HPA-1a phenotyping. *Vox Sang* 91(4):324–330. doi:10.1111/j.1423-0410.2006.00839.x
 64. Meyer O, Agaylan A, Borchert HH, Aslan T, Bombard S, Kiesewetter H, Salama A (2006) A simple and practical assay for the antigen-specific detection of platelet antibodies. *Transfusion* 46(7):1226–1231. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00874.x
 65. Mitchell E, Frith J, Newton J (2019) Fatigue and cognitive impairment in immune thrombocytopenic purpura remain stable over time: short report from a longitudinal study. *Br J Haematol* 186(5):777–781. doi:10.1111/bjh.15993
 66. Mithoowani S, Arnold DM (2019) First-Line Therapy for Immune Thrombocytopenia. *Hamostaseologie* 39(3):259–265. doi:10.1055/s-0039-1684031

67. Mo X, Liu L, López JA, Li R (2012) Transmembrane domains are critical to the interaction between platelet glycoprotein V and glycoprotein Ib-IX complex. *J Thromb Haemost* 10(9):1875–1886. doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04841.x
68. Monnet E, Sizaret P, Arbeille B, Fauvel-Lafève F (2000) Different Role of Platelet Glycoprotein GP Ia/IIa in Platelet Contact and Activation Induced by Type I and Type III Collagens. *Thromb Res* 98(5):423–433. doi:10.1016/s0049-3848(00)00199-7
69. Morodomi Y, Kanaji S, Won E, Ruggeri ZM, Kanaji T (2020) Mechanisms of anti-GPIb α antibody-induced thrombocytopenia in mice. *Blood* 135(25):2292–2301. doi:10.1182/blood.2019003770
70. Moulis G, Germain J, Comont T, Brun N, Dingremont C, Castel B, Arista S, Sailler L, Lapeyre-Mestre M, Beyne-Rauzy O, Godeau B, Adoue D, CARMEN Investigators Group (2017) Newly diagnosed immune thrombocytopenia adults: Clinical epidemiology, exposure to treatments, and evolution. Results of the CARMEN multicenter prospective cohort. *Am J Hematol* 92(6):493–500. doi:10.1002/ajh.24702
71. Naimushin YA, Mazurov AV (2005) Ability of different glycoprotein IIb-IIIa ligands to support platelet aggregation induced by activating antibody CRC54. *Biochemistry (Mosc)* 70(7):782–789. doi:10.1007/s10541-005-0184-2
72. Najaoui A, Bakchoul T, Stoy J, Bein G, Rummel MJ, Santoso S, Sachs UJ (2012) Autoantibody-mediated complement activation on platelets is a common finding in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Eur J Haematol* 88(2):167–174. doi:10.1111/j.1600-0609.2011.01718.x
73. Naz A, Mukry SN, Shaikh MR, Bukhari AR, Shamsi TS (2016) Importance of immature platelet fraction as predictor of immune thrombocytopenic purpura. *Pak J Med Sci* 32(3):575–579. doi:10.12669/pjms.323.9456
74. Neal MD (2020) The great platelet paradox: evolution of platelet contribution to hemostasis, inflammation, and thrombosis after injury. *Blood Adv* 4(11):2556. doi:10.1182/bloodadvances.2019001166
75. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L, Crowther MA, American Society of Hematology (2011) The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood* 117(16):4190–4207. doi:10.1182/blood-2010-08-302984
76. Neunert C, Terrell DR, Arnold DM, Buchanan G, Cines DB, Cooper N, Cuker A, Despotovic JM, George JN, Grace RF, Kühne T, Kuter DJ, Lim W, McCrae KR, Pruitt B, Shimanek H, Vesely SK (2019) American Society of Hematology 2019

- guidelines for immune thrombocytopenia. *Blood Adv* 3(23):3829–3866.
doi:10.1182/bloodadvances.2019000966
77. Neylon AJ, Saunders PW, Howard MR, Proctor SJ, Taylor PR (2003) Clinically significant newly presenting autoimmune thrombocytopenic purpura in adults: a prospective study of a population-based cohort of 245 patients. *Br J Haematol* 122(6):966–974. doi:10.1046/j.1365-2141.2003.04547.x
 78. Ogawara H, Handa H, Morita K, Hayakawa M, Kojima J, Amagai H, Tsumita Y, Kaneko Y, Tsukamoto N, Nojima Y, Murakami H (2003) High Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 71(4):283–288. doi:10.1034/j.1600-0609.2003.00138.x
 79. Panitsas FP, Theodoropoulou M, Kouraklis A, Karakantza M, Theodorou GL, Zoumbos NC, Maniatis A, Mouzaki A (2004) Adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is the manifestation of a type-1 polarized immune response. *Blood* 103(7):2645–2647. doi:10.1182/blood-2003-07-2268
 80. Peerschke EI (1992) Platelet membrane glycoproteins. Functional characterization and clinical applications. *Am J Clin Pathol* 98(4):455–463.
doi:10.1093/ajcp/98.4.455
 81. Peng J, Ma SH, Liu J, Hou Y, Liu XM, Niu T, Xu RR, Guo CS, Wang XM, Cheng YF, Ni H, Hou M (2014) Association of autoantibody specificity and response to intravenous immunoglobulin G therapy in immune thrombocytopenia: a multicenter cohort study. *J Thromb Haemost* 12(4):497–504. doi:10.1111/jth.12524
 82. Plow EF, Marguerie G, Ginsberg M (1987) Fibrinogen, fibrinogen receptors, and the peptides that inhibit these interactions. *Biochem Pharmacol* 36(23):4035–4040.
doi:10.1016/0006-2952(87)90558-2
 83. Poncz M, Eisman R, Heidenreich R, Silver SM, Vilaire G, Surrey S, Schwartz E, Bennett JS (1987) Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb. Homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors. *J Biol Chem* 262(18):8476–8482
 84. Porcelijn L, Huiskes E, Schipperus M, van der Holt B, de Haas M, Zwaginga JJ, Dutch HOVON 64 Study Group (2017) Lack of detectable platelet autoantibodies is correlated with nonresponsiveness to rituximab treatment in ITP patients. *Blood* 129(25):3389–3391. doi:10.1182/blood-2016-11-751719
 85. Porcelijn L, Huiskes E, Oldert G, Schipperus M, Zwaginga JJ, de Haas M (2018) Detection of platelet autoantibodies to identify immune thrombocytopenia: state of the art. *Br J Haematol* 182(3):423–426. doi:10.1111/bjh.15404
 86. Porcelijn L, Schmidt DE, Oldert G, Hofstede-van Egmond S, Kapur R, Zwaginga JJ, de Haas M (2020) Evolution and Utility of Antiplatelet Autoantibody Testing in

- Patients with Immune Thrombocytopenia. *Transfus Med Rev* 34(4):258–269.
doi:10.1016/j.tmr.2020.09.003
87. Provan D, Stasi R, Newland AC, Blanchette VS, Bolton-Maggs P, Bussel JB, Chong BH, Cines DB, Gernsheimer TB, Godeau B, Grainger J, Greer I, Hunt BJ, Imbach PA, Lyons G, McMillan R, Rodeghiero F, Sanz MA, Tarantino M, Watson S, Young J, Kuter DJ (2010) International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 115(2):168–186. doi:10.1182/blood-2009-06-225565
 88. Provan D, Arnold DM, Bussel JB, Chong BH, Cooper N, Gernsheimer T, Ghanima W, Godeau B, González-López TJ, Grainger J, Hou M, Kruse C, McDonald V, Michel M, Newland AC, Pavord S, Rodeghiero F, Scully M, Tomiyama Y, Wong RS, Zaja F, Kuter DJ (2019) Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood Adv* 3(22):3780–3817. doi:10.1182/bloodadvances.2019000812
 89. Quach ME, Dragovich MA, Chen W, Syed AK, Cao W, Liang X, Deng W, de Meyer SF, Zhu G, Peng J, Ni H, Bennett CM, Hou M, Ware J, Deckmyn H, Zhang XF, Li R (2018) Fc-independent immune thrombocytopenia via mechanomolecular signaling in platelets. *Blood* 131(7):787–796. doi:10.1182/blood-2017-05-784975
 90. Ramakrishnan V, Reeves PS, DeGuzman F, Deshpande U, Ministri-Madrid K, DuBridg RB, Phillips DR (1999) Increased thrombin responsiveness in platelets from mice lacking glycoprotein V. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23):13336–13341. doi:10.1073/pnas.96.23.13336
 91. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, Bussel JB, Cines DB, Chong BH, Cooper N, Godeau B, Lechner K, Mazzucconi MG, McMillan R, Sanz MA, Imbach P, Blanchette V, Kühne T, Ruggeri M, George JN (2009) Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 113(11):2386–2393. doi:10.1182/blood-2008-07-162503
 92. Roth GJ, Church TA, McMullen BA, Williams SA (1990) Human platelet glycoprotein V: A surface leucine-rich glycoprotein related to adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 170(1):153–161. doi:10.1016/0006-291x(90)91253-o
 93. Sachs UJ (2019) Diagnosing Immune Thrombocytopenia. *Hamostaseologie* 39(3):250–258. doi:10.1055/s-0039-1678739
 94. Savage B, Cattaneo M, Ruggeri ZM (2001) Mechanisms of platelet aggregation. *Curr Opin Hematol* 8(5):270–276. doi:10.1097/00062752-200109000-00002
 95. Schmidt DE, Lakerveld AJ, Heitink-Pollé KMJ, Bruin MCA, Vidarsson G, Porcelijn L, de Haas M (2020) Anti-platelet antibody immunoassays in childhood immune

- thrombocytopenia: a systematic review. *Vox Sang* 115(4):323–333.
doi:10.1111/vox.12894
96. Schneider W, Schnaidt M (1981) The platelet adhesion immunofluorescence test: a modification of the platelet suspension immunofluorescence test. *Blut* 43(6):389–392. doi:10.1007/BF00320318
 97. Schoonen WM, Kucera G, Coalson J, Li L, Rutstein M, Mowat F, Fryzek J, Kaye JA (2009) Epidemiology of immune thrombocytopenic purpura in the General Practice Research Database. *Br J Haematol* 145(2):235–244. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07615.x
 98. Segal JB, Powe NR (2006) Prevalence of immune thrombocytopenia: analyses of administrative data. *J Thromb Haemost* 4(11):2377–2383. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02147.x
 99. Shrestha S, Nazy I, Smith JW, Kelton JG, Arnold DM (2020) Platelet autoantibodies in the bone marrow of patients with immune thrombocytopenia. *Blood Adv* 4(13):2962–2966. doi:10.1182/bloodadvances.2020001846
 100. Shulman NR, Marder VJ, Weinrach RS (1965) Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura. Physiologic, serologic and isotopic studies. *Ann N Y Acad Sci* 124(2):499–542. doi:10.1111/j.1749-6632.1965.tb18984.x
 101. Singh G, Bansal D, Wright NAM (2020) Immune Thrombocytopenia in Children: Consensus and Controversies. *Indian J Pediatr* 87(2):150–157. doi:10.1007/s12098-019-03155-4
 102. Singh A, Uzun G, Bakchoul T (2021) Primary Immune Thrombocytopenia: Novel Insights into Pathophysiology and Disease Management. *J Clin Med* 10(789). doi:10.3390/jcm10040789
 103. Solanilla A, Pasquet JM, Viallard JF, Contin C, Grosset C, Déchanet-Merville J, Dupouy M, Landry M, Belloc F, Nurden P, Blanco P, Moreau JF, Pellegrin JL, Nurden AT, Ripoche J (2005) Platelet-associated CD154 in immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 105(1):215–218. doi:10.1182/blood-2003-07-2367
 104. Stief T (2019) Thrombozytenadhäsion. In: Gressner AM, Arndt T (Hrsg) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, 3. Aufl. Springer, Berlin Germany, S 2296. doi:10.1007/978-3-662-48986-4_3028
 105. Stockelberg D, Hou M, Jacobsson S, Kutti J, Wadenvik H (1996) Detection of platelet antibodies in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). A comparative study using flow cytometry, a whole platelet ELISA, and an antigen

- capture ELISA. *Eur J Haematol* 56(1-2):72–77. doi:10.1111/j.1600-0609.1996.tb00298.x
106. Tantawy AA, Elsherif NHK, Kenny MA, Aboufotouh KA, Hassan AE, Kabil ME (2020) Silent bleeding in children and adolescents with immune thrombocytopenia: relation to laboratory parameters and health related quality of life. *J Thromb Thrombolysis* 50(2):258–266. doi:10.1007/s11239-020-02036-4
107. Theis-Stephan A, Schupp M, Gerlach M (2020) Aufarbeitung von Blutproben. Arbeitsanweisung Allgemein. gültig für Standort: Gießen. Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie, UKGM, S 1–4
108. Theis-Stephan A, Schupp M, Gerlach M (2020) Direkter MAIPA (Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigen Assay). Arbeitsanweisung Methode. Arbeitsanweisung Methode. Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie, UKGM, S 1–8
109. Theis-Stephan A, Schupp M, Gerlach M (2020) Indirekter MAIPA (Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigen Assay). Arbeitsanweisung Methode. gültig für Standort: Gießen. Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie, UKGM:1–8
110. Theis-Stephan A, Schupp M, Gerlach M (2020) PAIFT (Plättchen-Adhäsions-Immunfluoreszenztest). Arbeitsanweisung Methode. gültig für Standort: Gießen. Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie, UKGM, S 1–7
111. Uff S, Clemetson JM, Harrison T, Clemetson KJ, Emsley J (2002) Crystal structure of the platelet glycoprotein Ib(alpha) N-terminal domain reveals an unmasking mechanism for receptor activation. *J Cell Biol* 277(38):35657–35663. doi:10.1074/jbc.M205271200
112. Voigt J, Schmidt J, Riss R, Schmitz M (2016) Physiologie und Pathophysiologie der Blutgerinnung. In: Kneser U, Horch RE, Lehnhardt M (Hrsg) *Grundkurs Mikrochirurgie*, 1. Aufl. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 15–24. doi:10.1007/978-3-662-48037-3_2
113. Vollenberg R, Jouni R, Norris PAA, Burg-Roderfeld M, Cooper N, Rummel MJ, Bein G, Marini I, Bayat B, Burack R, Lazarus AH, Bakchoul T, Sachs UJ (2019) Glycoprotein V is a relevant immune target in patients with immune thrombocytopenia. *Haematologica* 104(6):1237–1243. doi:10.3324/haematol.2018.211086
114. von dem Borne AE, Verheugt FW, Oosterhof F, von Riesz E, de la Rivière AB, Engelfriet CP (1978) A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Br J Haematol* 39(2):195–207. doi:10.1111/j.1365-2141.1978.tb01089.x

115. von dem Borne AE, Vos JJ, van der Lelie J, Bossers B, van Dalen CM (1986) Clinical significance of positive platelet immunofluorescence test in thrombocytopenia. *Br J Haematol* 64(4):767–776. doi:10.1111/j.1365-2141.1986.tb02239.x
116. Urbensky JR, Moore JE, Arnold DM, Smith JW, Kelton JG, Nazy I (2019) The sensitivity and specificity of platelet autoantibody testing in immune thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis of a diagnostic test. *J Thromb Haemost* 17(5):787–794. doi:10.1111/jth.14419
117. Wang Y, Zhang J, Su Y, Wang C, Zhang G, Liu X, Chen Q, Lv M, Chang Y, Peng J, Hou M, Huang X, Zhang X (2020) miRNA-98-5p Targeting IGF2BP1 Induces Mesenchymal Stem Cell Apoptosis by Modulating PI3K/Akt and p53 in Immune Thrombocytopenia. *Mol Ther Nucleic Acids* 20:764–776. doi:10.1016/j.omtn.2020.04.013
118. Xiao T, Takagi J, Coller BS, Wang JH, Springer TA (2004) Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 432(7013):59–67. doi:10.1038/nature02976
119. Zeng Q, Zhu L, Tao L, Bao J, Yang M, Simpson EK, Li C, van der Wal DE, Chen P, Spring CM, Wang M, Zhang L, Ruan C, Hou M, Xia R, Ni H (2012) Relative efficacy of steroid therapy in immune thrombocytopenia mediated by anti-platelet GPIIb/IIIa versus GPIIb/IIIa antibodies. *Am J Hematol* 87(2):206–208. doi:10.1002/ajh.22211
120. Zhai J, Ding M, Yang T, Zuo B, Weng Z, Zhao Y, He J, Wu Q, Ruan C, He Y (2017) Flow cytometric immunobead assay for quantitative detection of platelet autoantibodies in immune thrombocytopenia patients. *J Transl Med* 15(1):214. doi:10.1186/s12967-017-1317-2

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AK.....	Antikörper
AMR	Ashwell-Morell-Rezeptor
ANA.....	antinukleäre Antikörper
ANCA	antineutrophile zytoplasmatische Antikörper
ASH.....	American Society of Hematology
Az	Aktenzeichen
BAFF	B-cell activating factor
BSA	bovines Serumalbumin/Rinderalbumin
bspw	beispielsweise
bzw	beziehungsweise
CCP	cyclisches citrulliniertes Peptid
CD	cluster of differentiation
CELIA.....	competitive enzyme-linked immunoassay
CT.....	Computertomographie
DNA.....	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure, Ethylendiamintetraessigsäure
et al.....	et alli (Latein: und andere)
Evtl	eventuell
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FNAIT	fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie
GK	Glukokortikoide
GP	Glykoprotein, Glykoprotein
griech.....	griechisch
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPA.....	human platelet antigen
HSCs.....	hämatologische Stammzellen
HUS.....	hämolytisch-urämisches Syndrom
i.v.....	intravenös
ICUS.....	idiopathische Zytopenien unbestimmter Signifikanz
IFN.....	Interferon
iFOBT	immunological Faecal Occult Blood Test
IgG.....	Immunglobulin G
IL	Interleukin

inkl.	inklusive
IPF	immature platelet fraction
IQR	Interquartilsabstand
ITP	Immunthrombozytopenie
IVIG	intravenöse Immunglobuline
kDa	Kilodalton
LBD	ligand binding domain
MACE	modified antigen capture ELISA
MAIPA	monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens
MDS	myelodysplastische Syndrome
mind.	mindestens
MK	Megakaryozyten
MK-P	megakaryocyte progenitors, Promegakaryozyten
MPV	mean platelet volume
MSC	mesenchymal stem cells
NaCl	Natriumchlorid
NAIT	Neonatale Alloimmunthrombozytopenie
NCI CTCAE	National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events
neg.	negativ
NIBSC	The National Institute for Biological Standards and Control
OD	optische Dichte
OPSI	Overwhelming Post Splenectomy Infection
PAIFT	Plättchen-Adhäsions-Immunfluoreszenztest
PAIgG	platelet-associated IgG
PBS	Phosphate Buffered Saline
PIFT	Platelet Immunofluorescence Test
PLTs	platelets, deutsch: Thrombozyten
pos.	positiv
PSIFT	Plättchen-Suspensions_Immunfluoreszenztest
PTP	Post-Transfusions-Purpura
SLE	systemischer Lupus Erythematoses
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TFH	follikuläre T-Helferzelle
Th	T-Helferzelle
TPO	Thrombopoetin
TPO-R	Thrombopoetinrezeptor

TRA *Thrombopoetin-Rezeptor-Agonisten*
TTP..... *thrombotisch thrombozytopenischen Purpura*
TXA2 *Thromboxan A2*
TZ..... *Thrombozytenzahl*
u.a. *und andere, unter anderem*
UKGM..... *Unversitätsklinikum Giessen-Marburg*
upm *Umdrehungen pro Minute*
v.a..... *vor allem*
V.a. *Verdacht auf*
vWF *von-Willebrand-Faktor*
w/m..... *weiblich/männlich, weiblich/männlich*
ZNS *zentrales Nervensystem*

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathomechanismen der Thrombozytenelimination bei Immunthrombozytopenie (ITP).....	4
Abbildung 2: Veränderte Thrombozytopoese bei Immunthrombozytopenie-Patienten (ITP)	6
Abbildung 3: Modell der akuten und chronischen antikörpervermittelten Thrombozytenelimination durch Anti-GPI α -Antikörpern	7
Abbildung 4: Autoantikörper und weitere Immunglobuline von Thrombozyten	12
Abbildung 5: schematischer Aufbau des GP Ib/IX/V-Komplexes (von-Willebrand-Faktor-Rezeptor)	18
Abbildung 6: schematischer Aufbau des GP IIb/IIIa-Komplexes (Fibrinogen-Rezeptor)	20
Abbildung 7: Patientenkollektiv mit Verdachtsdiagnose ITP	26
Abbildung 8: Reihenfolge der Laboruntersuchungen des Untersuchungsprofils ‚V.a. Immunthrombozytopenie‘ im Thrombozytenlabor des Instituts für Klinische Immunologie, Transfusionsmedizin und Hämostaseologie am UKGM.	27
Abbildung 9: Testprinzip des direkter MAIPA.....	28
Abbildung 10: Anteil der Kinder und Erwachsenen der untersuchten Patienten mit der Verdachtsdiagnose ITP	34
Abbildung 11: Absolute Häufigkeitsverteilung der Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP	38
Abbildung 12: Relative Häufigkeitsverteilung der Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA.....	39
Abbildung 13: Relative Häufigkeitsverteilung der Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA.....	40
Abbildung 14: Relative Häufigkeitsverteilung der Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im Plättchenimmunfluoreszenztest.....	42
Abbildung 15: Thrombozytenzahl bei Kindern mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA.....	44
Abbildung 16: Geraden der linearen Regressionsanalyse der Ergebnisse des semiquantitativen Scores des direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V) und der Mediane der Thrombozytenzahl bei Kindern mit Verdachtsdiagnose ITP	45
Abbildung 17: Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA.....	47

Abbildung 18: Geraden der linearen Regressionsanalyse der Ergebnisse des semiquantitativen Scores des direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V) und der Mediane der Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP	48
Abbildung 19: Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA	49
Abbildung 20: Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA für die Glykoproteine GP IIb/IIIa und GP Ib/IX	54
Abbildung 21: Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA für die Glykoproteine GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V.....	56
Abbildung 22: Thrombozytenzahl bei Kindern mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA	59
Abbildung 23: Geraden der linearen Regressionsanalyse der Ergebnisse des semiquantitativen Scores des indirekten MAIPA (GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX) und der Mediane der Thrombozytenzahl bei Kindern mit Verdachtsdiagnose ITP	60
Abbildung 24: Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA.....	62
Abbildung 25: Geraden der linearen Regressionsanalyse der Ergebnisse des semiquantitativen Scores des indirekten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/IIa) und der Mediane der Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP	63
Abbildung 26: Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA	64
Abbildung 27: Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA für die Glykoproteine GP IIb/IIIa und GP Ib/IX	69
Abbildung 28: Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im indirekten MAIPA für die Glykoproteine GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa	71
Abbildung 29: Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im PIFT	74
Abbildung 30: Thrombozytenzahl bei Kindern mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA für den Glykoproteinkomplex GP IIb/IIIa oder GP Ib/IX.....	78

Abbildung 31: Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA	81
Abbildung 32: Thrombozytenzahl bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten MAIPA und im PIFT.....	85

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der Immunthrombozytopenie (ITP) nach Verlaufsform und Stadium ([16, 42, 54, 59]).....	2
Tabelle 2: Prognostische Faktoren und Risikoindikatoren für einen selbstlimitierenden oder chronischen Verlauf und das Auftreten schwerer Blutungen der ITP (aus [35, 59])	9
Tabelle 3: Bestandteile der Basis- und weiterführenden Diagnostik bei der ITP (modifiziert nach [59]).....	10
Tabelle 4: Differenzialdiagnosen bei V.a. ITP (nach [59]).....	13
Tabelle 5: Leitlinientherapie der ITP 2020 ([59])	16
Tabelle 6: Bewertung der photometrischen Messung beim direkten/indirekten MAIPA	30
Tabelle 7: Demographische Daten Kinder mit Verdachtsdiagnose ITP	36
Tabelle 8: Demographische Daten Erwachsene mit Verdachtsdiagnose ITP	37
Tabelle 9: Anteil der fehlenden Werte im direkten MAIPA (DM) für die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP	42
Tabelle 10: Anteil der fehlenden Werte im direkten MAIPA (DM) für die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP V bei Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP	43
Tabelle 11: Positive und negative Testergebnisse im direkten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP V) und Thrombozytenzahl (TZ) bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP	50
Tabelle 12: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und Ergebnis im direkten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP V	51
Tabelle 13: Anteil der fehlenden Werte im indirekten MAIPA (IM) für die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa bei Kindern mit der Verdachtsdiagnose ITP	57
Tabelle 14: Anteil der fehlenden Werte im indirekten MAIPA (IM) für die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa, GP Ib/IX und GP Ia/IIa bei Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP	57

Tabelle 15: Positive und negative Testergebnisse im indirekten MAIPA (GP IIb/IIIa, GP Ib/IX, GP Ia/IIa) und Thrombozytenzahl (TZ) bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP	65
Tabelle 16: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und Ergebnis im indirekten MAIPA GP IIb/IIIa, GP Ib/IX oder GP Ia/IIa	66
Tabelle 17: relativer Anteil der fehlenden Werte im Plättchenimmunfluoreszenztest bei Kindern und Erwachsenen mit der Verdachtsdiagnose ITP	72
Tabelle 18: Positive und negative Testergebnisse im Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT) und Thrombozytenzahl (TZ) bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP	74
Tabelle 19: Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert bei Kindern und Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und Ergebnis im Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT)	75
Tabelle 20: Gegenüberstellung der Stichprobengröße der untersuchten Gruppen "Testergebnis im direkten MAIPA (DM)" und "Testergebnis im indirekten MAIPA (IM)" für die Glykoproteinkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/IX	75
Tabelle 21: Gegenüberstellung der Stichprobengrößen der untersuchten Gruppen "Testergebnis im direkten MAIPA (DM) " und "Testergebnis im indirekten MAIPA (DM) und PIFT"	82

8.4 Weitere Ergebnisse

Tabellen

Thrombozytenzahl bei Kindern mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX

Direkter MAIPA		Indirekter MAIPA		n (465)	Median	IQR	Fehlende Werte (n)
GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	GP IIb/IIIa	GP Ib/IX				
-	-	-	-	253	76	37,25-132,8	1
+	-	-	-	11	48	28-92	0
-	+	-	-	3	24	17-119	0
-	-	+	-	48	73	31,25-135	0
-	-	-	+	27	84	48-228	0
+	+	-	-	18	67,5	25,5-103,5	0
+	-	+	-	6	56	28-128	0
+	-	-	+	3	70	64-118	0
-	+	+	-	1	32	32-32	0
-	+	-	+	2	65	28-102	0
-	-	+	+	22	83	39,2-246,5	0
+	+	+	-	11	66	26-97	0
+	+	-	+	12	27,5	21,5-58	0
+	-	+	+	5	57	14-74,5	0
-	+	+	+	3	55	39-154	0
+	+	+	+	40	48	22,25-67	0

Thrombozytenzahl bei Erwachsenen mit Verdachtsdiagnose ITP und mit positivem oder negativem Testergebnis im direkten und indirekten MAIPA GP IIb/IIIa und GP Ib/IX

Direkter MAIPA		Indirekter MAIPA		n (2689)	Median	IQR	Fehlende Werte (n)
GP IIb/IIIa	GP Ib/IX	GP IIb/IIIa	GP Ib/IX				
-	-	-	-	1585	84	47-122	2
+	-	-	-	52	49,5	27,75-83,5	0
-	+	-	-	24	46	21,25-73,25	0
-	-	+	-	327	83,5	47-119	1
-	-	-	+	189	84	45-122,5	0
+	+	-	-	52	46,5	19,25-77,75	0
+	-	+	-	54	48	22-92,5	0
+	-	-	+	10	76,5	44,25-140,3	0
-	+	+	-	14	53,5	23-71,75	0
-	+	-	+	18	57,5	15-111,3	0
-	-	+	+	160	80	45,5-110,8	0
+	+	+	-	34	49,5	25,5-90,75	0
+	+	-	+	37	36	22-57,5	0
+	-	+	+	29	60	31-80,5	0
-	+	+	+	6	46	35,73-134	0
+	+	+	+	98	46	23,75-80	0

8.5 Danksagung

Ich möchte mich bei den Menschen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit möglich wurde. Zunächst möchte ich meinem Doktorvater, Professor Dr. med. Gregor Bein, Leiter des Instituts für Klinische Immunologie, Transfusionsmedizin und Hämostaseologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, für seine Unterstützung, Geduld und wertvollen Ratschläge während des gesamten Prozesses danken. Seine Erfahrung und Expertise haben es mir ermöglicht diese Arbeit erfolgreich zu verfassen.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Dan Qiu, für die Bereitstellung der notwendigen Daten aus dem Laborinformationssystem des Thrombozytenlabors.

Frau Dr. med. Nina Cooper möchte ich danken, die immer ansprechbar war und mir bei fachspezifischen Fragen weitergeholfen hat. Besonders dankbar bin ich für Ihre Erfahrung und Einblicke in die Labormethoden, die in meiner Arbeit verwendet wurden. In diesem Sinne gilt mein Dank auch Astrid Giptner-Rieger, der leitenden medizinisch-technischen Laborassistentin, die mir meine Fragen schnell und präzise beantworten konnte.

Professor Dr. med. Ulrich Sachs bin ich dankbar für seine fachliche Unterstützung und sein freundliches Interesse an meiner Arbeit.

Ich bin auch dankbar für die Unterstützung meiner Freunde und Familie, die mich immer ermutigt und unterstützt haben. Ihr Vertrauen und ihr Rat haben mich motiviert, meine Arbeit fortzusetzen und zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

8.6 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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