

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe Universität
Frankfurt am Main
Medizinische Klinik III, Schwerpunkt Angiologie
(Direktor: Prof. Dr. med. A. Zeiher)

**MixCon-LA: Entwicklung und Validierung eines neuen
Testsystems zur Erfassung des Lupus-Antikoagulans im
Hinblick auf eine optimierte Labordiagnostik des
Antiphospholipid-Syndroms**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereiches Medizin der
Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main

vorgelegt von
Marek Christoph Humpich
aus Tomaszow Lubelski (PL)
Frankfurt am Main, 2004

Dekan: Herr Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referentin: Frau PD Dr. E. Lindhoff-Last
Koreferent: Herr Prof. Dr. T. Klingebiel

Datum der mündlichen Prüfung: 07.06.2005

Meinen Eltern

Danksagung

Meinen Eltern danke ich für ihre stetige moralische und finanzielle Unterstützung, die mir ein Medizinstudium und somit die Möglichkeit zur Promotion erst möglich gemacht haben.

Frau PD Dr. Lindhoff-Last danke ich für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung und die exzellente wissenschaftliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Jörn Schmitt für die über diese Arbeit hinausreichende freundschaftliche Zusammenarbeit und seine hilfreichen Ratschläge zu gegebener Zeit.

Nicht zuletzt danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die reibungslose und mit viel Freude verbundene Zusammenarbeit.

Abkürzungen

ACAS	Antikardiolipinantikörpersyndrom
AK	Antikörper
APC	Aktiviertes Protein C
APLs	Antiphospholipid Antikörper
APS	Antiphospholipid-Syndrom
aPTT	Aktiviert partielle Thromboplastinzeit
ARDS	Adult respiratory distress syndrome
BFP-STS	Biologischer falsch positiver Test für Syphilis
CAPS	Katastrophales Antiphospholipid-Syndrom
CMV	Cytomegalie-Virus
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
dRVVT	Dilute Russell's Viper Venom Time
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPH	Edema-proteinuria-hypertension gestosis
GPL-U	IgG-Phospholipid Unit
HELLP	Hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count
HIT	Heparininduzierte Thrombozytopenie
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Histokompatibilitätsantigen
Ig	Immunglobulin
INR	International Normalized Ratio; Prothrombinratio
kD	Kilodalton
LA	Lupus-Antikoagulans
LAS	Lupusantikoagulanssyndrom
LDL	Low-density lipoproteins
LR	Lupus-Ratio
MPL-U	IgM-Phospholipid Unit
MTA	Medizinisch-technische Assistentin
NP	Normalplasma
PAPS	Primäres Antiphospholipid-Syndrom

PAT	Patienten-Plasma
PAVK	Peripherer arterieller Verschluss
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
SAPS	Sekundäres Antiphospholipid-Syndrom
SD	Standardabweichung
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
TIA	Transitorische ischämische Attacke
tPA	Tissue plasminogen activator
TVT	Tiefe Venenthrombose
VK	Variationskoeffizient
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	ANTIPHOSPHOLIPID-ANTIKÖRPER	1
1.1.1	<i>Allgemeines und Historisches</i>	1
1.1.2	<i>Einteilung der Antiphospholipid-Antikörper</i>	2
1.1.2.1	Lupus Antikoagulans	5
1.1.2.2	Antikardiolipin-Antikörper	7
1.1.2.3	Anti- β 2-Glykoprotein 1-Antikörper	7
1.2	DAS ANTIPHOSPHOLIPID-SYNDROM (APS)	9
1.2.1	<i>Definition und Allgemeines</i>	9
1.2.2	<i>Klinik</i>	10
1.2.2.1	Angiologie	11
1.2.2.2	Nephrologie	11
1.2.2.3	Neurologie	11
1.2.2.4	Pneumologie	12
1.2.2.5	Kardiologie	12
1.2.2.6	Gastroenterologie	13
1.2.2.7	Intensivmedizin	13
1.2.2.8	Gynäkologie	14
1.2.2.9	Hämatologie	14
1.2.3	<i>Diagnostik</i>	14
1.2.4	<i>Pathophysiologie</i>	15
1.2.5	<i>Therapie</i>	16
1.3	ZIEL DER ARBEIT	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	GERÄTE UND REAGENZIEN	19
2.1.1	<i>Blutentnahme</i>	19
2.1.2	<i>Zentrifugation</i>	19
2.1.3	<i>Lagerung & Aufbereitung</i>	19
2.1.4	<i>Messungen</i>	19
2.1.4.1	STA-Automat	19
2.1.4.2	Reagenzien	20
2.2	PROBANDENKOLLEKTIVE	21

2.2.1	<i>Das Normalkollektiv</i>	21
2.2.1.1	Zusammensetzung des Kollektives	21
2.2.1.2	Entnahme und Verarbeitung der Proben	21
2.2.2	<i>Das Patientenkollektiv mit einem Antiphospholipid-Syndrom (APS)</i> ...	22
2.2.2.1	Zusammensetzung des Kollektives	22
2.2.2.2	Entnahme und Verarbeitung der Proben	24
2.2.3	<i>Das Patientenkollektiv mit intravenöser Heparintherapie</i>	24
2.2.3.1	Zusammensetzung des Kollektives	24
2.2.3.2	Entnahme und Verarbeitung der Proben	24
2.2.4	<i>Das Patientenkollektiv mit oraler Antikoagulation</i>	24
2.2.4.1	Zusammensetzung des Kollektives	24
2.2.4.2	Entnahme und Verarbeitung der Proben	25
2.2.5	<i>Das Patientenkollektiv mit Hämophilie A</i>	25
2.2.5.1	Zusammensetzung des Kollektives	25
2.2.5.2	Entnahme und Verarbeitung der Proben	25
2.3	DATENERFASSUNG & STATISTIK.....	26
2.3.1	<i>Messwerte der Gerinnungsdiagnostik</i>	26
2.3.2	<i>Fragebögen</i>	26
2.4	TESTDEFINITIONEN	28
2.4.1	<i>Vorbereitung der Proben für die Messungen</i>	28
2.4.2	<i>MixCon-LA</i>	28
2.4.2.1	Testverfahren	28
2.4.2.2	Reproduzierbarkeit	30
2.4.2.3	Bestimmung des Grenzwertes.....	30
2.4.2.4	Spezifität und Sensitivität.....	30
2.4.3	<i>Dilute Russell's Viper Venom Time (dRVVT)</i>	30
2.4.4	<i>PTT-Tauschtest</i>	31
2.4.5	<i>ELISA-Immunoassays</i>	32
2.4.5.1	Antikardiolipin	32
2.4.5.2	Anti-β2-Glykoprotein I.....	32
2.4.6	<i>APC-Resistenz</i>	33
3	ERGEBNISSE	34
3.1	REPRODUZIERBARKEIT	34
3.1.1	<i>Messungen im Vergleich innerhalb eines Tages (Intraassay)</i>	34

3.1.2	<i>Messungen im Tagesvergleich (Interassay)</i>	36
3.1.3	<i>Variationskoeffizienten</i>	38
3.1.4	<i>Definition des Grenzwertes</i>	39
3.2	SPEZIFITÄT UND SENSITIVITÄT	40
4	DISKUSSION	47
4.1	BEURTEILUNG DER TESTERGEBNISSE	47
4.2	NORMWERTBESTIMMUNG	50
4.3	SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT	51
4.4	ZUSAMMENFASSUNG	54
5	LITERATURVERZEICHNIS	55
6	ANHANG	72
6.1	ZUSAMMENFASSUNG IN ENGLISCHER SPRACHE	72
6.2	LEBENS LAUF	73
6.3	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	74

1 Einleitung

1.1 Antiphospholipid-Antikörper

1.1.1 Allgemeines und Historisches

Bei den Antiphospholipid-Antikörpern (APLs) handelt es sich um eine heterogene Familie von erworbenen Antikörpern. Als Antigen dient ein Komplex aus einem negativ geladenen Phospholipid und einem Plasmaprotein. Das Interesse an APLs begann 1906, als Wassermann einen serologischen Test für *Treponema Pallidum*, den Erreger der Syphilis, vorstellte. Er gab dem in diesem Test erfassten Antigen den Namen „Reagin“. Pangborn zeigte 1941, dass es sich bei der aktiven antigenen Komponente nicht um ein für das *Treponema Pallidum* spezifisches Epitop handelt, sondern um ein im menschlichen Organismus ubiquitär vorkommendes Phospholipid, welches erstmals die Bezeichnung Kardiolipin erhielt (1 Pangborn MC., 1941). Im Jahre 1950 zeigte sich erstmals, dass eine große Anzahl von Personen in diesem Test positiv reagierte, ohne jedoch an Syphilis zu leiden. Dieses Phänomen wurde als der biologische falsch positive Test für Syphilis (BFP-STS) bezeichnet (2 Moore J.E., 1952). Es konnte gezeigt werden, dass vorübergehend positive Ergebnisse im BFP-STS bei Patienten mit akuten Infektionen nach Abklingen der Erkrankung nicht wiederholbar waren (3 Vaarala O., 1986) und dass Patienten mit persistierend positiven BFP-STS in der Mehrzahl einen systemischen Lupus erythematodes aufwiesen (4 Moore J.E., 1955). Im Jahre 1951 gelang es, einen weiteren Antikörper gegen Phospholipide zu beschreiben. Müller et al. berichteten damals über einen ungewöhnlichen Hemmkörper der Blutgerinnung (5 Müller J.F., 1951), bei dem sich später herausstellen sollte, dass dieser nicht gegen Gerinnungsfaktoren, sondern gegen Phospholipide gerichtet ist (6 Triplett D.A., 1989). Dieser im Plasma zirkulierende Gerinnungsinhibitor führte zur Verlängerung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes, weshalb sich für diesen Inhibitor die Bezeichnung „Lupus Antikoagulans“ bzw. „LA-Phänomen“ einbürgerte (7 Feinstein D.I., 1972). Diese Namensgebung ist jedoch irreführend und leider unglücklich gewählt, weil sich dieses Phänomen auch unabhängig von dem Vorhandensein eines SLE zeigt (8 Frick P.G., 1955) und klinisch die Patienten paradoxerweise venöse wie auch arterielle Thrombosen bekommen (9 Bick R.L., 2001), obwohl die *in-vitro*

demonstrierte Verlängerung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) eher eine Blutungsneigung vermuten ließe.

1.1.2 Einteilung der Antiphospholipid-Antikörper

Die Einteilung der Antiphospholipid-Antikörper erfolgt primär nach der verwendeten Labormethode. Abbildung 1.1 soll die Systematik verdeutlichen:

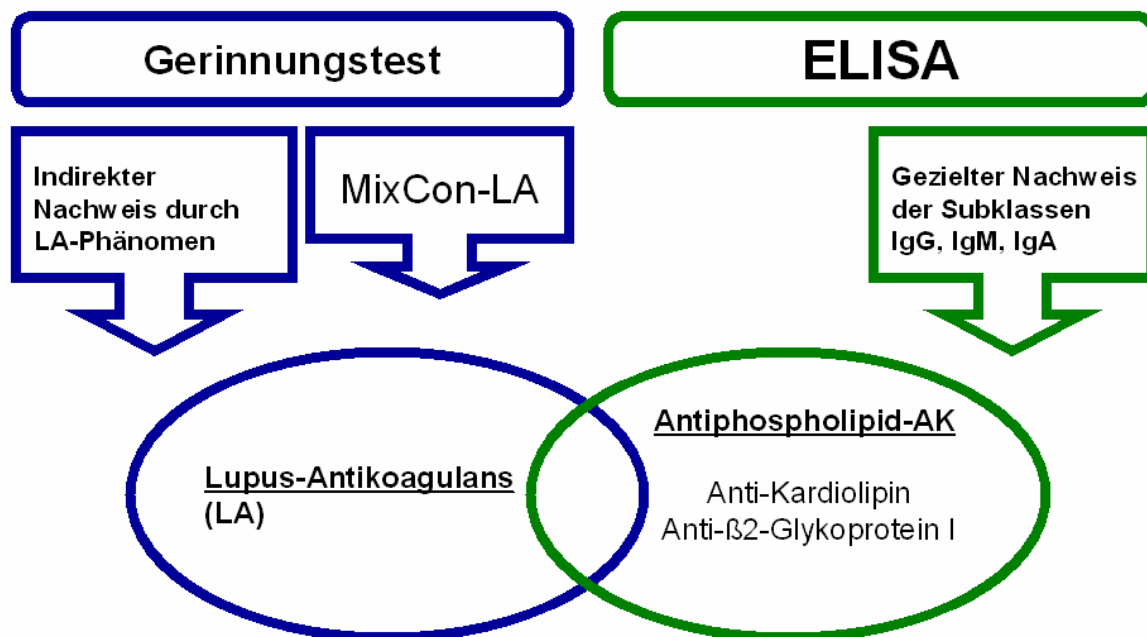


Abbildung 1.1: Labordiagnostik des APS

Auf der einen Seite ist es möglich, mit Hilfe eines phospholipid-abhängigen Gerinnungstests das Vorhandensein von Antiphospholipid-Antikörpern im Plasma nachzuweisen. Hier macht man sich das LA-Phänomen zunutze, indem die Konzentration an Phospholipiden in den verwendeten Reagenzien sehr gering ist und diese somit den limitierenden Faktor bei den Messungen darstellen. Bei Vorhandensein von Antiphospholipid-Antikörpern werden die Phospholipide von den Antikörpern abgefangen und stehen dann nicht mehr für die Reaktion zur Verfügung. Die Gerinnungskaskade kann nicht mehr in Gang gesetzt werden, und es resultiert eine Verlängerung der Gerinnungszeit. Diese Methode stellt einen indirekten Nachweis von Antiphospholipid-Antikörpern dar, so dass bei der Durchführung dieser Methode andere Ursachen einer Verlängerung der Gerinnungszeit ausgeschlossen werden müssen. Die durch diese Methode erfassten Antikörper werden als Lupus Antikoagulans bezeichnet.

Auf der anderen Seite stehen ELISA-basierte Tests zur Verfügung, mit denen ein gezielter Nachweis bestimmter Antiphospholipid-Antikörper möglich ist. So ist es mit dieser Methodik insbesondere auch möglich, die einzelnen Immunglobulin-Klassen der Antiphospholipid-Antikörper zu erfassen. Die Antikörper tragen jeweils den Namen des Proteins aus dem Phospholipid-/Proteinkomplex, gegen den der Antikörper gerichtet ist. Es existieren derzeit Nachweismethoden für eine Reihe von Untergruppen der Antiphospholipid-Antikörper, auf die hier nicht genauer eingegangen wird. Die in der Abbildung 1.1 skizzierte Schnittmenge der beiden Methoden weist auf ein bedeutendes Problem bei der Interpretation der Laborwerte hin. Die Kreuzreaktivität zwischen den einzelnen Antikörpern und dem LA-Phänomen, wie auch die Kreuzreaktivität innerhalb der einzelnen Antikörper ist bis dato nicht hinreichend untersucht und derzeit Gegenstand diverser Forschungsprojekte. Daher steht die Antwort auf die Frage, welche Antiphospholipid-Antikörper eine bedeutende klinische Relevanz haben, weiterhin aus. Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht diverser Antiphospholipid-Antikörper (10 Triplet D.A., 2002).

Mögliche Zielantigene der Antiphospholipid-Antikörper	
Kardiolipin	Komplement Faktor H
β2-glycoprotein I	Gerinnungsfaktor VII/VIIa
Prothrombin	Aktiviertes Protein C
Protein S	Komplement Faktor C4
Gerinnungsfaktor XII	Annexin V
Hoch molekular gewichtetes Kininogen	Niedrig molekular gewichtetes Kininogen
Oxidiertes low-density Lipoprotein	Gewebsplasminogenaktivator (tPA)

Tabelle 1.1: Mögliche Ziele der Antiphospholipid-Antikörper

Die Antiphospholipid-Antikörper stellen somit eine sehr heterogene Gruppe von Antikörpern dar, die sich entweder nur mit den ELISA-Testverfahren, nur mit Hilfe phospholipid-abhängiger Gerinnungsteste oder mit beiden Testverfahren nachweisen lassen.

Die im Folgenden vorgestellten 3 Untergruppen haben aktuell in der Labordiagnostik des Antiphospholipid-Syndroms die größte klinische Relevanz und werden daher genauer beschrieben.

1.1.2.1 Lupus Antikoagulans

Das Lupus-Antikoagulans wird oft als „Antikörper“ im klassischen Sinne bezeichnet, wobei der Eindruck entsteht, dass es sich dabei um eine singuläre, morphologisch *direkt* fassbare chemische Struktur handelt. Dies ist jedoch nicht der Fall, vielmehr handelt es sich bei dem Lupus-Antikoagulans um ein laborchemisches Phänomen, durch welches mittels Gerinnungstests *indirekt* eine heterogene Gruppe von Antiphospholipid-Antikörpern nachgewiesen wird. Per definitionem sind Lupusantikoagulantien Immunglobuline der Klassen IgG, IgM, IgA oder Mischungen dieser, welche mit einem oder mehreren phospholipid-abhängigen in vitro-Testen der Blutgerinnung interferieren. Das Lupus-Antikoagulans richtet sich gegen negativ geladene Phospholipide des Prothrombinaktivator-Komplexes, was zur Verlängerung der phospholipid-abhängigen Gerinnungsteste führt. Ein vermehrtes Auftreten von Thrombosen bei Patienten mit Lupus-Antikoagulans wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt (11 Gastineau D.A., 1985). Demnach liegt die Häufigkeit eines thromboembolischen Ereignisses in der Größenordnung von 30% (12 Lechner K., 1985). Obwohl Thrombosen bei Patienten mit Lupus erythematoses ohne Lupus-Antikoagulans ebenfalls möglich sind, ist bei Gegenwart des Lupus-Antikoagulans das Thromboserisiko um ein Vielfaches vermehrt (13 Pazner R., 1986). Die Analyse der thromboembolischen Ereignisse ergab, dass venöse Thrombosen und Lungenembolien mit 34% bei den betroffenen Patienten am häufigsten vorkamen, dass jedoch auch arterielle Thrombosen bei 25% der Patienten auftraten. Die arteriellen Thrombosen manifestierten sich überwiegend im Bereich der zerebralen Gefäße und der Beinarterien. Bereits vor über 25 Jahren wurde berichtet, dass es bei Schwangeren mit Lupus-Antikoagulans zu einem auffälligen Zusammentreffen von wiederholten Aborten im ersten Trimenon und intrauterinem Fruchttod im zweiten und dritten Trimester kam. Es wurde damals ein Zusammenhang zwischen Aborten, intrauterinem Fruchttod und Mikrothrombosen der Plazentastrombahn postuliert (14 Nilsson I.M., 1975).

Eine oft zufällig entdeckte, mäßig verlängerte aPTT lässt ohne entsprechende Klinik zunächst keine sichere Einordnung zu, ob es sich um einen Faktorenmangel oder ein Lupus-Antikoagulans handelt. Daher ist bei Verdacht auf das Vorhandensein eines Lupus-Antikoagulans eine weiterführende standardisierte Diagnostik in drei Schritten notwendig. Als erstes wird ein Suchtest (Screening) durchgeführt. Hierbei wird im

Blutplasma die phospholipid-abhängige Gerinnungszeit gemessen, wobei entscheidend ist, dass die Konzentration der Phospholipide der limitierende Faktor ist. Eine außerhalb der Norm verlängerte Gerinnungszeit ist ein erster Hinweis auf ein Lupus-Antikoagulans. In einem zweiten Schritt, wird diese Messung wiederholt, hierbei wird jedoch das zu untersuchende Plasma mit einem ebenfalls phospholipid-armen Normalplasma gemischt, so dass eventuelle Mängel an Gerinnungsfaktoren ausgeglichen werden, der limitierende Faktor aber weiterhin die Konzentration der Phospholipide bleibt. Kommt es zu einer Verkürzung der initial verlängerten Gerinnungszeit, so ist ein erblicher oder erworbener Mangel an Gerinnungsfaktoren anzunehmen. Normalisiert sich jedoch die im ersten Schritt verlängerte Gerinnungszeit nach Zugabe von Normalplasma nicht, so ist ein dritter Schritt notwendig, damit die Phospholipidabhängigkeit dieses Phänomens bestätigt werden kann. Hierzu wiederholt man nochmals die Messung unter Zusatz von Phospholipiden im Überschuss und schaut, ob sich die vormals abnormale Gerinnungszeit wieder normalisiert. Diese weitere Diagnostik anhand internationaler Kriterien (15 Wilson W.A., 1999) (16 Arnout J., 2002) ist in Abbildung 1.2 zusammengefasst.



Abbildung 1.2: Labordiagnostik des Lupus-Antikoagulans nach internationalen Kriterien

1.1.2.2 Antikardiolipin-Antikörper

Kardiolipin ist ein stickstofffreies Phospholipid mit einem Molekulargewicht von 21 kD, das in verschiedenen Geweben vorkommt. Antikardiolipin-Antikörper sind eine heterogene Gruppe von Autoantikörpern mit diversen Kreuzreaktivitäten. Sie waren neben dem Lupus-Antikoagulans anfangs die einzige Untergruppe der Antiphospholipid-Antikörper, die mit thromboembolischen Ereignissen in Verbindung standen (17 Bick R.L., 1999), (18 Bick R.L., 1999). Es ist bekannt, dass in vitro Antikardiolipin-Antikörper für die Bindung an Kardiolipin einen Kofaktor im Serum benötigen, welcher als β 2-Glykoprotein I identifiziert wurde (19 Sheng Y., 1998). Das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen Kardiolipin ist oft mit der Entwicklung von arteriellen und/oder venösen Thrombosen, sowie auch mit wiederholten spontanen Aborten (20 McNeil H.P., 1990) assoziiert. Antikardiolipin-Antikörper wurden anfangs nur mit dem systemischen Lupus erythematodes in Verbindung gebracht. Spätere Untersuchungen zeigten zusätzlich einen Zusammenhang mit dem Auftreten von Thrombozytopenien (21 Triplett D.A., 1990), Herzinfarkten bei jungen Patienten (22 Hamsten A., 1986), cerebralen Thrombosen (23 Harris E.N., 1984) sowie anderen Autoimmunkrankheiten (24 Font J., 1989). Antikardiolipin-Antikörper der Klasse IgA lassen sich in der Mehrzahl der Patienten mit fulminantem Leberversagen nachweisen. Dabei besteht eine inverse Korrelation zwischen dem Antikörpertiter und dem noch intaktem Leberparenchym (25 Tada K., 1995).

1.1.2.3 Anti- β 2-Glykoprotein 1-Antikörper

Anti- β 2-Glykoprotein I-Antikörper sind ein Mitglied der so genannten „short-consensus-repeat“-Familie. Es handelt sich um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 50 kD, welches im Plasma in einer Konzentration von ungefähr 200 μ g/ml vorliegt (26 McNeil H.P., 1990). Das β 2-Glykoprotein I ist durch fünf sogenannte „sushi domains“ gekennzeichnet. Die fünfte dieser „sushi domains“ beinhaltet eine Bindungsstelle für aktivierte Oberflächen von Körperzellen (27 Bouma B., 1999). Die dreidimensionale Darstellung dieser Domänen zeigt die Form eines Fisches, was zu dieser exotischen Namensgebung führte. Die fünfte „sushi domain“ ist reich an Lysin, welches für die Bindung an aktivierten Oberflächen von Körperzellen verantwortlich ist. Die physiologische Funktion des β 2-Glykoprotein I ist weiterhin ungeklärt. In vitro Studien haben gezeigt, dass β 2-Glykoprotein I die Aktivität der Prothrombinase hemmt, einem Enzym, welches eine wichtige Rolle im

Zusammenspiel mit der Blutgerinnungskaskade und der Plättchenaggregation spielt (28 Schousboe I., 1985). β 2-Glykoprotein I scheint darüber hinaus bei der Beseitigung von apoptotischen Zellen beteiligt zu sein (29 Koike T., 1998). Antiphospholipid-Antikörper binden hauptsächlich an β 2-Glykoprotein I in der vierten und fünften Sushi Domäne, obwohl hier auch die erste „sushi domain“ als Ziel in Frage kommt und entsprechende pathophysiologische Konsequenzen aufweist (30 McNeeley P.A., 2001). Das Vorhandensein von Lupusantikoagulantien verstärkt die Bindung von β 2-Glykoprotein I an aktivierten Oberflächen von Körperzellen. Anti- β 2-Glykoprotein I-Antikörper können direkt gemessen werden und scheinen eine höhere Spezifität in Bezug auf die klinischen Manifestationen eines Antiphospholipid-Syndroms zu haben als Antikardiolipin-Antikörper. Dies wurde in mehreren Studien gezeigt, die allerdings überwiegend retrospektiv waren und viele Patienten mit einem systemischen Lupus erythematodes eingeschlossen hatten (31 Tsutsumi A., 1996), (32 Roubey R.A., 1996), (33 Cabiedes J., 1995).

1.2 Das Antiphospholipid-Syndrom (APS)

1.2.1 Definition und Allgemeines

Das Antiphospholipid-Syndrom ist unterteilt in ein primäres APS (PAPS) und ein sekundäres APS (SAPS) (34 Lao M., 2001). Wird die Diagnose eines APS ohne das Vorliegen einer Grunderkrankung gestellt, so spricht man von einem primären APS (35 Asherson R.A., 1989). Das PAPS zeigt eine familiäre Häufung von 14% (36 Goldberg S.N., 1995) sowie eine Assoziation mit bestimmten HLA-Typen (37 McNeil H.P., 1990). Wird die Diagnose hingegen im Rahmen einer Systemerkrankung, einer akuten oder chronischen Infektion oder der Einnahme von bestimmten Medikamenten gestellt, liegt ein sekundäres APS vor. Zu den häufigsten auslösenden Medikamenten zählen Chlorpromazin, Phenothiazin, Phenytoin, Hydralazin, Procainamid, Quinidin, Streptomycin und Clozapin. Die häufigste Systemerkrankung, die zu einem sekundären Antiphospholipid-Syndrom führt, ist der systemische Lupus erythematodes. Bei 31% der Patienten mit systemischem Lupus erythematodes (SLE) können Lupus Antikoagulantien nachgewiesen werden, 40% weisen Antikardiolipin-Antikörper auf. Umgekehrt sind allerdings mindestens 50% aller Patienten mit Antiphospholipid Antikörpern nicht an einem SLE erkrankt. Weitere Krankheiten, die ein sekundäres APS bedingen können, sind das Sjögren-Syndrom, die rheumatoide Arthritis (38 Jedryka-Goral A., 1992), der Morbus Behcet (39 Hull R.G., 1984), die Sklerodermie (40 Malia R.G., 1988), autoimmunhämolytische Anämien (41 Schleider M.A., 1976), die idiopathische thrombozytopenische Purpura (42 Stasi R., 1994) und die Enzephalomyelitis disseminata (43 Hughes G.R., 1999). Eine Reihe von Infektionen kann ebenfalls ein sekundäres Antiphospholipid-Syndrom triggern, wobei hier eher virale Erreger (Hepatitis C, EBV, HIV, CMV und Varicella) eine bedeutende Rolle zu spielen scheinen. Zwar wurden Antiphospholipid-Antikörper auch gehäuft bei diversen bakteriellen Infektionen beobachtet, das klinische Bild eines APS bleibt in diesen Fällen im Gegensatz zu Infektionen viraler Genese jedoch meist aus (44 Asherson R.A., 2003). Des Weiteren wurden erhöhte Titer von Antiphospholipid-Antikörpern bei Patienten mit Neoplasien und thromboembolischen Komplikationen beobachtet und können somit ein sekundäres APS bei diesen Patienten bedingen (45 Asherson R.A., 2000).

Die klinische Symptomatik zeigt sich in erster Linie in einer ausgeprägten Neigung zu arteriellen und venösen Thrombosen, rezidivierenden Aborten, sowie oft auch einer Thrombozytopenie. Je nach Art der Antiphospholipid-Antikörper kann ein APS noch genauer in ein Lupusantikoagulanssyndrom (LAS) oder ein Antikardiolipinantikörpersyndrom (ACAS) unterschieden werden (46 Bick R.L., 1993). Auch hier muss zwischen primärer und sekundärer Genese differenziert werden. Bei dem primären LAS prägen überwiegend venöse Thrombosen das klinische Bild (47 Cervera R., 1993) , während sich die sekundäre Form des LAS eher in Veränderungen der Herzklappen, erniedrigten Spiegel der C4 Komponente des Komplementsystems sowie Neutropenien manifestiert (48 Waddell C.C., 1982). Das Antikardiolipinsyndrom wird je nach Organmanifestation in vier Untergruppen eingeteilt (46 Bick R.L., 1993). Der Typ-I zeichnet sich durch tiefe Beinvenenthrombosen und/oder Lungenembolien aus, beim Typ-II hingegen dominieren arterielle Thrombosen im Bereich der Herzkranzgefäße, der Aorta, der Carotiden wie auch der peripheren arteriellen Aufzweigungen. Vom Typ-III des Antikardiolipinsyndroms spricht man, wenn transiente cerebrale ischämische Attacken, cerebrovaskuläre Thrombosen oder Verschlüsse der die Retina versorgenden Gefäße das klinische Bild prägen. Der Typ-IV ist insgesamt sehr selten und beschreibt eine Kombination der Typen I-III des Antikardiolipinsyndroms.

Mit einem Verhältnis von 1:5 wird das Lupusantikoagulanssyndrom wesentlich seltener beobachtet als das Antikardiolipinantikörpersyndrom. Antikardiolipinantikörper finden sich vor allem bei älteren Normalpersonen. Die Inzidenz schwankt zwischen 12 (49 Fields R.A., 1989) und 52% (50 Manoussakis M.N., 1987). Im Gegensatz dazu beträgt die Prävalenz des Lupus-Antikoagulans in der Normalbevölkerung zirka 5 bis 8%, wobei hier überwiegend junge Frauen betroffen sind (51 McNeil H.P., 1991).

1.2.2 Klinik

Die wesentliche klinische Manifestation des Antiphospholipid-Syndroms ist eine ausgeprägte Thrombophilie. Dementsprechend zeichnet sich das klinische Spektrum durch eine erhebliche Bandbreite aus. Es sind nahezu alle Disziplinen der inneren Medizin sowie die Nachbardisziplinen betroffen. Im Folgenden sollen die häufigsten klinischen Manifestationen des Antiphospholipid-Syndroms zusammengefasst werden.

1.2.2.1 Angiologie

Am häufigsten werden akute venöse und / oder arterielle Thrombosen beobachtet, wobei insgesamt 24% aller Patienten mit einem systemischem Lupus erythematodes rezidivierende Thrombosen in der Vorgeschichte aufweisen. (51 McNeil H.P., 1991). Hierbei ist zu bemerken, dass Patienten mit nachgewiesenen Antiphospholipid-Antikörpern mit 42% häufiger Thrombosen hatten als Patienten mit SLE ohne Antiphospholipid-Antikörper. Hier wiesen nur 13% Thrombosen auf. Dabei ist der Nachweis eines Lupus-Antikoagulans mit einem höheren Thromboserisiko assoziiert als der Nachweis von Antikardiolipin-Antikörpern. Das Thromboserisiko steigt mit der Höhe des Antiphospholipid-Antikörper-Titers an (52 Vianna J.L., 1994). Bei Patienten ohne Zeichen eines Lupus erythematodes korreliert lediglich der Nachweis von Lupus-Antikoagulans, nicht jedoch der von Antikardiolipin-Antikörpern mit dem Auftreten venöser Thromboembolien (53 Ginsberg J.S., 1995).

1.2.2.2 Nephrologie

Eine typische Komplikation des Antiphospholipid-Syndroms ist eine ein- oder beidseitige Nierenvenenthrombose mit drohendem Verlust der betroffenen Niere. Man findet im Zusammenhang mit einem Antiphospholipid-Syndrom sowohl die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz als auch rapid progressive Verläufe mit konsekutiver terminaler, dialysepflichtiger Niereninsuffizienz (54 Mandreoli M., 1993). Im Rahmen chronischer Glomerulonephritiden findet sich eine Antiphospholipid-Antikörperhäufigkeit von 9% (55 Quereda C., 1994). Bei Patienten mit terminaler, dialysepflichtiger Niereninsuffizienz unklarer Genese liegt diese sogar bei 30%. Im Gegensatz zu Antikardiolipin-Antikörpern scheinen Lupusantikoagulantien in diesem Patientenkollektiv signifikant mit dem Auftreten von Fistelthrombosen korreliert zu sein (56 Brunet P., 1995). Auch bei differentialdiagnostischen Überlegungen bezüglich eines nephrotischen Syndroms sollte an ein Antiphospholipid-Syndrom gedacht werden (57 Piette J.C., 1994).

1.2.2.3 Neurologie

Im Vordergrund der neurologischen Symptomatik stehen zentrale Ischämien. Das klinische Spektrum reicht dabei von einzelnen umschriebenen Herden bis hin zu einem Multiinfarktsyndrom (58 Montalban J., 1991) mit konsekutiver Demenz (59 Chapman J., 2002). Lassen sich dabei im Rahmen des ersten zentralischämischen Insultes Antiphospholipid-Antikörper nachweisen, so liegt das Rezidivrisiko für einen

weiteren Schlaganfall bei 18,7% pro Jahr und 15,2% für eine transitorische ischämische Attacke (60 Levine S.R., 1992). Besonders bei jungen Frauen sollten migräneartige Kopfschmerzen an ein Antiphospholipid-Syndrom denken lassen (61 Hughes G.R., 2003). Weitere Symptome wie Epilepsie, rezidivierende ischämische Attacken bzw. Amaurosis fugax oder auch das Auftreten einer transversalen Myelopathie (62 Asherson R.A., 2003) können Manifestationen eines Antiphospholipid-Syndroms sein. Anzumerken ist jedoch, dass lediglich zentrale Ischämien definitiv mit dem Antiphospholipid-Syndrom korrelieren, hingegen andere neurologische, insbesondere neuropsychiatrische Syndrome (63 Sanna G., 2003), keine sichere Assoziation aufweisen (64 Chapman J., 2003).

1.2.2.4 Pneumologie

Als Emboliequelle kommen bei Lungenembolien meist tiefe Beinvenenthrombosen (65 Alarcon-Segovia D., 1989) in Betracht, seltener auch rechtsventrikuläre Thromben (66 O'Hickey S., 1993). Bei der Hälfte der Patienten mit einem primären Antiphospholipid-Syndrom lässt sich in der Vorgeschichte eine tiefe Beinvenenthrombose evaluieren, wovon wiederum 50% zusätzlich eine Lungenembolie erlitten haben (35 Asherson R.A., 1989). In wenigen Fällen ist auch das Auftreten einer pulmonalen Hypertonie als Folge rezidivierender Lungenembolien beschrieben (67 Asherson R.A., 1986). Es finden sich außerdem bei 10% der Patienten mit idiopathischer pulmonaler Hypertonie Antiphospholipid-Antikörper. Es wurde ebenfalls ein Zusammenhang eines primären Antiphospholipid-Syndroms mit einem „adult respiratory distress syndrome (ARDS)“ beschrieben (68 Ghosh S., 1993).

1.2.2.5 Kardiologie

Im Rahmen eines Antiphospholipid-Syndroms werden unabhängig von einer präexistierenden Herzerkrankung sowohl Thrombosen der großen epikardialen Gefäße als auch eine diffuse thrombotische Mikroangiopathie (69 Asherson R.A., 1993) beobachtet. Hierbei findet sich eine Infarktinzidenz von 6,5% (70 Asherson R.A., 1989). Es findet sich weiterhin eine positive Korrelation zwischen der Höhe des Titers von Antiphospholipid-Antikörpern zum Zeitpunkt einer aortokoronaren Bypass-Operation und der Inzidenz von Bypassverschlüssen zwölf Monate nach dem operativen Eingriff. Sowohl beim primären als auch beim sekundären Antiphospholipid-Syndrom treten in 40% der Fälle Herzklappenveränderungen auf.

Überwiegend betroffen ist dabei der linkskardiale Klappenapparat mit deutlicher Bevorzugung der Mitralklappe. Betrachtet man hingegen dabei das sekundäre Antiphospholipid-Syndrom isoliert, so findet sich eine häufigere Beteiligung des rechtsventrikulären Klappenapparates. Hier weisen 13% der Patienten eine Aorten-, 39% eine Mitralklappe- und 87% eine Trikuspidalinsuffizienz auf (71 Sturfelt G., 1992). (72 Morton K.E., 1986). Eine weitere Arbeit konnte diese Beobachtungen jedoch nur im Rahmen eines sekundären APS bestätigen (73 Gabrielli F., 1995).

1.2.2.6 Gastroenterologie

Thromboembolische Komplikationen im Bereich des Gastrointestinaltraktes betreffen auch die Mesenterialgefäße (74 Sanchez-Guerrero J., 1992) und führen zu ischämischen Pankreatitiden oder rezidivierenden Leberinfarkten (75 Mackworth-Young C.G., 1989). Antiphospholipid-Antikörper stellen nach der Einnahme von oralen Antikonzeptiva die häufigste benigne Ursache des Budd-Chiari-Syndroms (76 Pelletier S., 1994) dar. Eine signifikante Korrelation besteht zudem zwischen Antiphospholipid-Antikörpern und dem Vorliegen einer Alkoholhepatitis und einer äthyltoxischen Leberzirrhose (77 Chedid A., 1994).

1.2.2.7 Intensivmedizin

Obwohl die meisten Patienten mit einem Antiphospholipid-Syndrom thromboembolische Komplikationen an einer einzelnen anatomischen Lokalisation im Gefäßsystem entwickeln, verläuft nach derzeitigen Schätzungen in ca. 0,8% dieses Krankheitsbild als so genanntes „Katastrophales Antiphospholipid-Syndrom“ (CAPS) (78 Cervera R., 2002). Es handelt sich dabei um ein fulminant verlaufendes Geschehen, bei welchem multiple Thrombosen in mindestens drei Organsystemen zu beobachten sind und die Patienten innerhalb weniger Tage intensivmedizinische Überwachung benötigen. Obwohl auch Gefäße größeren Kalibers betroffen sein können, führen thrombotische mikroangiopathische Verschlüsse der kleinen Gefäße zu einem Versagen multipler Organe. In der Hälfte der Fälle werden gleichzeitig Nieren, Lunge, ZNS, Herz und die Haut in die Symptomatik miteinbezogen. Die Mortalität beträgt infolge eines Multiorganversagens annähernd 50% (79 Asherson R.A., 1998). Das klinische Bild kann dem der thrombotischen thrombozytopenischen Purpura (TTP) ähneln (80 Cerveny K.C., 1999). Es bestehen einige Gemeinsamkeiten zwischen diesen beiden Krankheitsbildern. Daher ist eine exakte

Diagnosestellung für therapeutische Schritte sehr wichtig, da im Gegensatz zum CAPS bei der TTP eine Antikoagulation kontraindiziert ist.

1.2.2.8 Gynäkologie

Bei 10 – 30% aller Frauen mit rezidivierenden Spontanaborten lassen sich Antiphospholipid-Antikörper nachweisen (81 Lockwood C.J., 1989). Bei Patienten mit einem SLE steigt das Risiko, ein oder mehrere Spontanaborte zu erleiden, von 25 auf 40 bis 80%, wenn sich Antiphospholipid-Antikörper nachweisen lassen (82 Buchanan N.M., 1992). Pathophysiologisch stehen rezidivierende Thrombosen der die Plazenta versorgenden Gefäße mit nachfolgender Plazentainsuffizienz im Vordergrund. Als häufigste maternale Komplikationen werden die Eklampsie und das HELLP-Syndrom beschrieben. Das HELLP-Syndrom ist eine relativ seltene Komplikation des schwangerschaftsinduzierten Bluthochdrucks (früher als EPH-Gestose oder Präeklampsie bezeichnet), die charakterisiert ist durch das gleichzeitige Auftreten von Hämolyse (H), erhöhten Leberenzymwerten (elevated liver enzymes = EL) und einer Thrombozytopenie (low platelet count = LP).

1.2.2.9 Hämatologie

Eine Thrombozytopenie wird bei etwa 20 bis 30% der Patienten mit einem primären Antiphospholipid-Syndrom beobachtet (83 Harris E.N., 1985). Bei Patienten mit einem sekundären APS im Rahmen eines SLE ist eine Thrombozytopenie stärker mit dem Vorhandensein von Lupus Antikoagulans (45%) als mit dem Nachweis von Antikardiolipin-Antikörpern (29%) assoziiert. Ob bei diesen Patienten die Antiphospholipid-Antikörper eine alleinige Rolle in der Ätiologie der Thrombozytopenie spielen, ist fraglich und bedarf weiterer Studien.

1.2.3 Diagnostik

Die Diagnostik des APS beruht nach den Sapporo-Kriterien (15 Wilson W.A., 1999) auf dem klinischen Nachweis von thromboembolischen Komplikationen, sowohl auf der venösen wie auch arteriellen Seite des Gefäßsystem oder / und rezidivierenden Spontanaborten, verbunden mit einem wiederholten Nachweis von Antiphospholipid-Antikörpern. Der Nachweis muss in zwei methodisch unterschiedlichen Testsystemen zum Zeitpunkt der Testung wie auch in einem Abstand von mindestens 6 Wochen gelingen. Erst dann darf die Diagnose eines APS gestellt werden. Uneinigkeit besteht weiterhin bei der Festlegung der genauen Normwerte.

Eine genaue Beschreibung der verschiedenen Antikörper und deren Nachweismethoden ist unter 1.1.2 (siehe Seite 2) zu finden und soll hier nicht wiederholt erwähnt werden.

1.2.4 Pathophysiologie

Die genaue Pathogenese, auf deren Grundlage es im Rahmen eines Antiphospholipid-Syndroms zu thromboembolischen Ereignissen kommt, ist bis dato nicht hinlänglich verstanden. Es existieren mehrere Hypothesen, die Mechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene beschreiben, und so die Rolle der Antiphospholipid-Antikörper bei der Entstehung von Thrombosen zu erklären versuchen.

Ein möglicher Ansatz ist die Aktivierung von Endothelzellen. Durch Bindung von Antiphospholipid-Antikörpern an Endothelzellen des Gefäßsystems kommt es zu einer Hochregulation und Expression von Adhäsions-Molekülen, Sekretion von Zytokinen und der Metabolisierung von Prostazyklin (84 Matsuda J., 1997). Antiphospholipid-Antikörper erkennen β 2-Glykoprotein I, das an ruhende Endothelzellen gebunden ist. Es ist jedoch nicht bekannt, auf welche Weise genau das β 1-Glykoprotein I mit lebensfähigen Endothelzellen interagiert (85 Meroni P.L., 1998).

Eine weitere Theorie postuliert eine durch oxidative Prozesse vermittelte Schädigung des vaskulären Endothels. Oxidiertes LDL, das einen großen Stellenwert bei der Entstehung der Atherosklerose hat, wird von Makrophagen aufgenommen. Dies führt zu einer Aktivierung der Makrophagen und folglich zu einer Schädigung der Endothelzellen (86 Ames P.R., 1994). Autoantikörper gegen oxidiertes LDL stellen eine Gruppe von Antiphospholipid-Antikörpern dar und einige Antikardiolipin-Antikörper kreuzreagieren mit oxidiertem LDL (87 Vaarala O., 1993). Ferner binden Antikardiolipin-Antikörper an oxidiertes Kardioprotein, jedoch nicht an die reduzierte Form. Dies ist ein Hinweis dafür, dass Antikardiolipin-Antikörper oxidierte Phospholipide, phospholipid-bindende Proteine oder auch beides erkennen und binden können (88 Horkko S., 1996).

Als dritte Möglichkeit für die Thrombogenität von Antiphospholipid-Antikörpern ist eine Interaktion mit oder Modulation der Funktion der phospholipid-bindenden

Proteine, welche für die Regulation und Homöostase der Blutgerinnung zuständig sind, anzunehmen. Obwohl wenig über die biologische Funktion des β 2-Glykoprotein I bekannt ist, spricht einiges dafür, dass es einen natürlicher Inhibitor der Blutgerinnung darstellt (89 Kandiah D.A., 1994). Es wurden in diesem Zusammenhang Interaktionen mit der regulierenden Funktion von Prothrombin, Protein C, Annexin V und Gewebefaktor beschrieben (90 Oosting J.D., 1993) .

Diese pathophysiologischen Überlegungen der Thrombogenität der Antiphospholipid-Antikörper ähneln insgesamt gesehen den Mechanismen, welche für die thromboembolischen Ereignisse bei der Heparin induzierten Thrombozytopenie (HIT) bedeutsam sind (91 Gruel Y., 2000). Bei der HIT kommt es trotz Heparintherapie ebenso wie bei dem Antiphospholipid-Syndrom neben einer Thrombozytopenie durch heparin-induzierte Antikörper zu multiplen arteriellen als auch venösen Thrombosen.

1.2.5 Therapie

Die medikamentöse Antikoagulation stellt das Therapieprinzip des Antiphospholipid-Syndroms dar. Wichtigstes Ziel hierbei ist die Verhinderung von rezidivierenden Thrombosen. Bezüglich der Dosierung und Auswahl des Antikoagulans existiert zur Zeit nur eine prospektive, randomisierte und doppel-blind durchgeführte Studie (92 Crowther M.A., 2003). Die aktuelle Empfehlung zielt auf eine moderate bis intensivierete orale Antikoagulation. Die Ziel-INR sollte zwischen 2.0 und 3.0 liegen. Die INR ist eine internationale Einheit, die es ermöglicht, die Ergebnisse einer Quick-Bestimmung zwischen verschiedenen Labors miteinander zu vergleichen. Der Quickwert hingegen ist ein Parameter, der die Aktivität der Vitamin-K abhängigen Gerinnungsfaktoren mit erfasst und daher zur Therapie-Kontrolle bei Patienten unter oraler Antikoagulation verwendet wird.

Dennoch muss darauf hingewiesen werden, dass eine Antikoagulation ein Problem bei der Diagnostik des APS darstellt. Wie bereits oben beschrieben, basieren die laborchemischen Nachweismethoden für das Lupus-Antikoagulans auf Gerinnungstests, die durch Medikamente wie Phenprocoumon (Marcumar®) beeinflusst werden. Phenprocoumon (Marcumar®) ist in Deutschland das Standardpräparat bei der oralen Antikoagulation. Es hemmt hierbei in der Leberzelle kompetitiv das Enzym Epoxydreduktase im Vitamin-K-Zyklus und dadurch den

Vitamin-K-abhängigen Reaktionsschritt in der Synthese der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X, Protein S und C. Dabei entstehen fehlgebildete Faktoren, die aufgrund der fehlenden Kalziumbindungsfähigkeit im Gerinnungssystem nicht aktiv werden können (93 Kemkes-Matthes B., 2001).

Auch das im stationären Bereich eingesetzte unfraktionierte Heparin hat störende Effekte bei der Bestimmung des Lupus-Antikoagulans. Heparin ist ein Polysaccharid und bewirkt durch eine Verstärkung der gerinnungshemmenden Aktivität des körpereigenen Antithrombins eine Inhibition diverser Serumproteasen (Faktor IXa, Xa, XIa, XIIa) des Gerinnungssystems.

Der in dieser Arbeit vorgestellte Labortest zum Nachweis des Lupus-Antikoagulans sollte daher auch möglichst unempfindlich gegenüber den Effekten des Phenprocoumon (Marcumar®) und Heparin sein.

1.3 Ziel der Arbeit

Die Qualität eines Labortests steht und fällt mit seiner Spezifität und Sensitivität beim Nachweis pathologischer Befunde. Darüber hinaus sind eine einfache, möglichst vollautomatisierte Handhabung sowie eine gute Reproduzierbarkeit normaler und pathologischer Messwerte (Präzision) zu fordern.

Der in dieser Arbeit entwickelte Test hat zum Ziel, die bis dato schwierige und nicht einheitliche Labordiagnostik des Antiphospholipid-Syndroms zu vereinfachen und standardisieren. Um die Qualität des MixCon-LA zu untersuchen, wurden einerseits über mehrere Tage kommerziell erhältliche Lupus-Antikoagulans-negative und Lupus-Antikoagulans-positive Testseren mit diesem Test-Verfahren auf Lupusantikoagulantien untersucht, und andererseits ein Patientenkollektiv mit dem Vollbild eines Antiphospholipid-Syndroms im Vergleich zu einem Blutspenderkollektiv evaluiert. Die internationalen Kriterien zur Diagnostik der APS empfehlen im Rahmen der Labordiagnostik die Erfassung des Lupus-Antikoagulans. Dies ist bis dato teilweise umständlich, da wie zuvor beschrieben (siehe 1.1.2.1, Seite 5) drei Schritte notwendig sind (Screening-, Mixing-, Confirm-Verfahren).

Bei der Entwicklung des MixCon-LA wurde auf folgende Aspekte besonders Wert gelegt: 1.) Der Test sollte mit kommerziell erhältlichen Reagenzien durchführbar sein, 2.) er sollte vollautomatisch durchführbar sein, und er sollte auf die verschiedenen in Gerinnungslabors eingesetzten Gerinnungsautomaten adaptierbar sein. Darüber hinaus sollte er gegenüber therapeutisch angewendeten Antikoagulantien wie Marcumar oder Heparin unempfindlich sein und möglichst Misch- und Bestätigungsverfahren in einem Testansatz beinhalten.

Ein solches Testverfahren steht bisher zum Nachweis von Lupusantikoagulantien nicht zur Verfügung.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Reagenzien

2.1.1 Blutentnahme

Desinfektion: Neo – Kodan™ farblos Spray, der Firma S. und M. Schülke & Mayr, Ch.-B.: 1037059

Butterfly: Venofix™ 21G (0,8 x 20 mm) mit 30 cm Schlauch, der Firma B. Braun Melsungen AG, Ch.-B.: 01B18825B1 und 99A14825B2

Adapter: Multiadapter, der Firma Sarstedt Aktiengesellschaft & Co. Nümbrecht, Ch.-B.: 9220744 und 10990744

Monovetten: 10 ml S-Monovette™ 9 NC, der Firma Sarstedt Aktiengesellschaft & Co. Nümbrecht, Ch.-B.: 9196507C und 1002991C

2.1.2 Zentrifugation

RG's: Röhren, 5ml (75 mm x 13mm Ø), der Firma Sarstedt; No.: 55.475

Zentrifuge: Rotina 48 RC™ (Temp.: 18 °C, RPM: 3160, T: 2x 15 min.), der Firma Hettich Zentrifugen Tuttlingen

Pipetten: Reference™ 500 ml und 1000 ml, der Firma Eppendorf – Netheler – Hinz GmbH, Hamburg

2.1.3 Lagerung & Aufbereitung

Cups: Mikro – Schraubröhre 2ml aus PP, der Firma Sarstedt; Ref. No.: 72.609

Truhen: Herafreeze™ (Model Nr. HFC 386 STD – V14) sowie HFU 86 - 450, der Firma Heraeus Instruments GmbH

Wärmeblock: Thermomixer compact™ (Temp.: 37 °C, short mix 1100 U/min) , der Firma Eppendorf

2.1.4 Messungen

2.1.4.1 STA-Automat

STA-Gerinnungsautomat der Firma Boehringer Mannheim

Drucker: Canon BJC 5000

STA Diluent Buffer™, der Firma Diagnostica Stago/Roche, Ch.-B.: 609199
Verwendbar bis 04/2002

STA Desorb. Solution, der Firma Diagnostica Stago/Boehringer Mannheim, Ch.-B.:
694251 Verwendbar bis 11/2000

STA Washing – Solution™, der Firma Diagnostica Stada, CH.-B.: 609409
Verwendbar bis 01/2003

Küvetten: STA Cuvettes™, der Firma Diagnostica Stada, Ch.-B.: 314900

2.1.4.2 Reagenzien

Aqua Dest: Aqua ad iniectabilia Braun, der Firma Braun, Ch.-B.: 1154A95
Verwendbar bis 03/2006

Normalplasma: IL – Test Normal c.p™. Instrumentaion Laboratory (IL), Mailand,
Italien, Ch.-B.: N0906574, Verwendbar bis 03/2003

Pathologische Lupus-Kontrolle: Lupus Inhibitor Plasma, der Firma Immuno AG
Vienna, Ch.-B.: 2V01000, Verwendbar bis 06/2002

aPTT-SP: IL, Mailand, Italien, Ch.-B.: N0706533, Verwendbar bis 02/2002

Haemoliance SynthAFax aPTT: IL, Mailand, Italien, Ch.-B.: N0205355, Verwendbar
bis 02/2002

Calcium-Chlorid mit Polybrene: Heparin resistant CaCl₂, Gradipore, North Ryde,
Australien, Ch.-B.: H9J014Ba, Mailand, Italien, Verwendbar bis 10/2001

LAC-Screen: IL, Mailand, Italien, Ch.-B.: H9J023Aa, Verwendbar bis 10/2001

LAC-Confirm: IL, Mailand, Italien, Ch.-B.: H9L005Aa, Verwendbar bis 12/2001

Lupus-sensitive aPTT: PTT-LT, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, Ch.-B.:
609361 Verwendbar bis 10/2002

Factor V-Mangelplasma: Coatest APC-Resistance V Kit, Haemochrom Diagnostica,
Essen, Germany

2.2 Probandenkollektive

2.2.1 Das Normalkollektiv

2.2.1.1 Zusammensetzung des Kollektives

Es wurden 500 freiwillige Blutspender des DRK Hessen zwischen dem 10.09.1999 und 30.06.2000 konsekutiv erfasst. Dieses Kollektiv dient als Vergleichsgruppe für eine von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Studie, die nicht Teil dieser Arbeit ist. Ein Subkollektiv von 99 konsekutiven Blutspendern bildete für diese Arbeit das Normalkollektiv. Eingeschlossen wurden nur Blutspender, die am Tag der Entnahme auch für eine Blutspende zugelassen waren und folgende Einschlusskriterien erfüllten: Alter zwischen 18 und 70 Jahren, in der Vorgeschichte keine venöse Thrombose, keine Lungenembolie, keinen Koronarinfarkt, keinen Schlaganfall, keine Lebererkrankung, keine Thrombophlebitis und kein Tumorleiden sowie keine aktive Infektion in den letzten 4 Wochen.

2.2.1.2 Entnahme und Verarbeitung der Proben

Die Probanden durchliefen zuerst die üblichen Formalitäten des Blutspendedienstes. Dann folgten ein Aufklärungsgespräch mit anschließender Unterzeichnung der Einverständniserklärung und ein gemeinsames Ausfüllen eines standardisierten Fragebogens. Die Entnahme von 20 ml Vollblut erfolgte vor der eigentlichen Blutspende mindestens 20 min. nach Eintreffen des Probanden beim Blutspendedienst beim liegendem Probanden durch eine gesonderte Punktion einer Brachialvene des nicht für die Blutspende vorgesehen Armes mittels einer Butterfly-Nadel in 2 mit 0.11 M Natrium-Citrat gefüllte Monovetten mit jeweils 10 ml Volumen. Hieraus resultierte ein Verhältnis von Blut/Citrat von 9/1. Das gewonnene Vollblut wurde dann im Gerinnungslabor der Angiologie für 15 Minuten bei 18 Grad Celsius mit 1500 g zentrifugiert, das Plasma anschließend in ein Reagenzglas abpipptiert und dieses dann erneut für 15 min bei 18 Grad Celsius bei 1500 g zentrifugiert. In einem Zeitfenster von max. 3 h nach Blutentnahme wurde das Plasma nach Portionierung in 15 x 0,5 ml Micro-Cups für die spätere Verarbeitung bei -70 Grad Celsius tiefgefroren.

2.2.2 Das Patientenkollektiv mit einem Antiphospholipid-Syndrom (APS)

2.2.2.1 Zusammensetzung des Kollektives

Es wurde für die Validierung des MixCon-LA-Tests eine Gruppe von 15 konsekutiven Patienten der Angiologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik I, des Zentrums für Innere Medizin der Universitätsklinik Frankfurt in einem Zeitraum vom 01.01.2000 bis zum 31.12.2001 eingeschlossen. Einschlusskriterium war das Vorhandensein eines APS gemäß internationalen Kriterien (15 Wilson W.A., 1999). Von diesen 15 Patienten wiesen 7 einen systemischen Lupus erythematodes mit sekundärem APS, die übrigen 8 ein primäres APS auf. Um die Diagnose eines APS zu sichern, wurde das Patientenblut mittels des dRVVT-Tests und als zweiten empfohlenen Test mittels der lupussensitiven aPTT auf das Vorhandensein von Lupusantikoagulantien untersucht. Zusätzlich wurden Antikardiolipin IgG und IgM- Antikörper bestimmt. Bei einem im Mindestabstand von 2 Monaten positiven Testergebnis im dRVVT-Test und/oder aPTT-Verfahren und für das APS typischen klinischen Symptomen wie arteriellen und/oder venösen Thrombosen und/oder Fehlgeburten wurde der entsprechende Patient in die Studie eingeschlossen. Tabelle 2.1 zeigt die demographischen Daten dieser Patienten.

Patienten- Nummer	Alter	Geschlecht	Diagnosen	SLE	Antikoagulation
1	63	männlich	Multiple Hirninfarkte	ja	Aspirin
2	48	weiblich	Hirninfarkt, Augenvenen- Thrombose, multiple Herzinfarkte	ja	Oral
3	30	weiblich	Lungenembolie, TVT, 2 x Fehlgeburt	ja	niedermolekulares Heparin
4	51	männlich	TVT, Herzinfarkt	nein	Oral
5	34	weiblich	TVT, TIA	ja	Oral
6	44	männlich	Lungenembolie, TVT, PAVK	ja	Oral
7	73	weiblich	TVT, Herzinfarkt, PAVK	ja	Oral
8	35	weiblich	PAVK, Hirninfarkt	nein	Aspirin
9	54	männlich	PAVK, TVT, HIT	nein	Oral
10	63	weiblich	Raynaud-Syndrom, TVT, Lungenembolie	nein	niedermolekulares Heparin
11	39	weiblich	TVT, Lungenembolie	ja	niedermolekulares Heparin
12	68	männlich	TVT, PAVK	nein	niedermolekulares Heparin
13	47	männlich	PAVK	ja	Aspirin
14	57	weiblich	TVT	nein	Oral
15	43	weiblich	TVT	nein	Oral

Table 2.1: Demographic Data of Patients with APS

TVT: Tiefe Venenthrombose; PAVK: Peripherer arterieller Verschluss; HIT: Heparininduzierte Thrombozytopenie; SLE: Systemischer Lupus erythematoses; TIA: Transitorische ischämische Attacke.

2.2.2.2 Entnahme und Verarbeitung der Proben

Die Blutentnahme erfolgte während der Laborroutine durch die anwesende MTA bei Vorstellung des Patienten in unserer Ambulanz. Die Blutentnahme erfolgte entweder bei Erstvorstellung des Patienten, bei Wiedervorstellung oder im Rahmen der Marcumarsprechstunde. Unter Verwendung der gleichen Utensilien wie bei dem Normalkollektiv wurde eine Armvene punktiert und das gewonnene Vollblut auf die gleiche Art und Weise wie bei dem Normalkollektiv (siehe 2.2.1.2, Seite 21) verarbeitet. In einem Zeitfenster von max. 3h nach Blutentnahme wurde das Plasma für die spätere Verarbeitung in Micro-Cups bei -70 Grad Celsius tiefgefroren. Der aufnehmende Arzt füllte mit den Patienten einen standardisierten Fragebogen aus.

2.2.3 Das Patientenkollektiv mit intravenöser Heparintherapie

2.2.3.1 Zusammensetzung des Kollektives

Es wurden konsekutiv 10 stationäre Patienten der Intensivstation der medizinischen Klinik I des Zentrums für Innere Medizin der Universitätsklinik Frankfurt im Zeitraum von 01.05.2001 bis zum 05.05.2001 eingeschlossen. Einschlusskriterien waren die intravenöse Gabe von unfraktioniertem Heparin in therapeutischer Dosierung. Ein APS war bei diesen Patienten nicht bekannt.

2.2.3.2 Entnahme und Verarbeitung der Proben

Die Blutentnahme erfolgte durch den Doktoranden auf der Intensivstation. Die Verarbeitung der Proben erfolgte wie unter 2.2.1.2 (siehe Seite 21) beschrieben.

2.2.4 Das Patientenkollektiv mit oraler Antikoagulation

2.2.4.1 Zusammensetzung des Kollektives

Es wurden konsekutiv 19 Patienten der Marcumarsprechstunde der Angiologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik I des Zentrums für Innere Medizin der Universitätsklinik in einem Zeitraum vom 01.01.2000 bis zum 31.03.2000 eingeschlossen. Einschlusskriterium war die Einnahme von oralen Antikoagulantien und kein vorbekanntes APS.

2.2.4.2 Entnahme und Verarbeitung der Proben

Die Blutentnahme erfolgte während der Marcumarsprechstunde in unserer Ambulanz durch die anwesende MTA. Die Verarbeitung der Proben erfolgte wie unter 2.2.1.2 (siehe Seite 21) beschrieben.

2.2.5 Das Patientenkollektiv mit Hämophilie A

2.2.5.1 Zusammensetzung des Kollektives

Es wurden 5 konsekutive ambulante Patienten der Medizinischen Klinik I des Zentrums für Innere Medizin der Universitätsklinik Frankfurt im Zeitraum von 01.01.2001 bis zum 01.12.2001 eingeschlossen. Das Einschlusskriterium war das Vorliegen einer Hämophilie A. Die Hämophilie A ist ein angeborener Mangel des Gerinnungsfaktors VIII. Diese Anomalie verursacht eine Verlängerung der PTT und interferiert somit beim Nachweis der Lupusantikoagulantien. Daher ist eine differentialdiagnostische Abgrenzung der Hämophilie A bei der laborchemischen Bestimmung der Lupusantikoagulantien besonders wichtig. Darüber hinaus entwickeln einige der Patienten mit einer Hämophilie A unter der therapeutischen Substitution des Faktors VIII einen Hemmkörper gegen diesen Faktor, so dass, ebenfalls aufgrund einer Verlängerung der PTT der Nachweis der Lupusantikoagulantien problematisch sein kann.

2.2.5.2 Entnahme und Verarbeitung der Proben

Die Blutentnahme erfolgte in unserer Ambulanz durch die anwesende MTA. Die Verarbeitung der Proben erfolgte wie unter 2.2.1.2 (siehe Seite 21) beschrieben.

2.3 Datenerfassung & Statistik

2.3.1 Messwerte der Gerinnungsdiagnostik

Die einzelnen Messwerte der Gerinnungsanalysen wurden auf einen an die STA-Maschine angeschlossenen Drucker ausgegeben und anschließend zur weiteren Bearbeitung in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 97 eingegeben. Zur statistischen Analyse wurde die Daten in das Programm SPSS für Windows V10 übernommen und ausgewertet.

2.3.2 Fragebögen

Die Ergebnisse der mit den Probanden gemeinsam ausgefüllten Fragebögen wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 97 eingegeben und ausgewertet. Abbildung 2.1 zeigt einen solchen Fragebogen.



Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Zentrum der Inneren Medizin - Medizinische Klinik I
Schwerpunkt Angiologie

Fragebogen Thrombophilie

Datum:

Name, Vorname:.....
 Geburtsdatum:
 Adresse/Telefon:
 Geschlecht: männlich weiblich
 Gewicht:kg Größe:cm

Ausschlusskriterien für die Studie

	ja	nein
Venöse Thrombose	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lungenembolie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Myokardinfarkt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schlaganfall	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Antikoagulantientherapie (z.B: Marcumar, Heparin s.c.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Infektion , wenn ja , wie lange zurückliegend?, HIV	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tumorleiden	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lebererkrankungen (z.B. Leberzirrhose)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Thrombophlebitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Weitere statistische Informationen (kein Ausschlusskriterium !)

<i>Arteriosklerose-Risikofaktoren</i>	ja	nein	<i>Vorgeschichte</i>	ja	nein
Raucher	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Arthritis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diabetes mellitus	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Nierenerkrankung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bluthochdruck	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Blutungsneigung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hyperlipidämie (Cholesterin)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			

<i>Familienanamnese</i>	ja	nein	wer
„offene Beine“	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
venöse Thrombose	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Lungenembolie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Thrombophlebitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

<i>Gynäkologische Fragen</i>	ja	nein	
Pille	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Seit wann
Hormonsubstitution (postmenopausal)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Welche Wann
Fehl- oder Totgeburt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SSW
Schwangerschaften	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Anzahl
Schwangerschaftskomplikationen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Art

Medikamente :.....

Abbildung 2.1: Fragebogen, der zusammen mit den Probanden ausgefüllt wurde.

2.4 Testdefinitionen

2.4.1 Vorbereitung der Proben für die Messungen

Die bei -70°C tiefgefrorenen Plasmen wurden nach Entnahme aus der Gefriertruhe zunächst für 10 min in einen Wärmeblock gestellt und auf eine Temperatur von 37°C erwärmt. Es wurden jeweils immer 24 Proben gemeinsam aufgetaut. Diese Zahl wurde durch die maximale Kapazität des Wärmeblocks bestimmt. Darauf hin wurden die Plasmen für weitere 10 min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend die STA-Maschine mit diesen Proben geladen. Der weitere Ablauf der Messung erfolgte automatisch in der Maschine, die vorher entsprechend auf die folgenden Tests programmiert worden war. Vor jeder Messreihe wurden sowohl ein Normalplasma wie auch eine pathologische Kontrolle gemessen.

2.4.2 MixCon-LA

2.4.2.1 Testverfahren

Das Testverfahren beruht auf dem Testprinzip des aPTT-basierten Lupus Ratio Testes (LR) (94 Schjetlein R., 1993). Für die Testdurchführung wurde der STA Gerinnungs-Automat verwendet und das Verfahren automatisiert. Tabelle 2.2 zeigt die entsprechenden Programm-Einstellungen des Gerinnungs-Automaten. Der erste Schritt bestand darin, dass $50\ \mu\text{l}$ des zu messenden Plasmas in einem 1:1 Verhältnis mit $50\ \mu\text{l}$ Normalplasma gemischt wurden. Daraufhin wurde die aPTT einmal mit dem aPTT-SP-Reagenz, welches eine niedrige Phospholipidkonzentration enthält, und ein zweites Mal mit dem SynthAFax-Reagenz, welches eine hohe Phospholipidkonzentration enthält, gemessen. Bei beiden Messungen wurden anschließend $50\ \mu\text{l}$ einer heparin-resistenten Calciumchlorid-Lösung hinzugefügt, die Polybrene enthält, um falsch positive Testergebnisse bei Proben, die Heparin enthalten, zu vermeiden. In dem gleichen Durchgang wurde zusätzlich die aPTT eines Normalplasmas sowohl mit dem phospholipid-armen wie auch mit dem phospholipid-reichen Reagenz gemessen. Für jede zu messende Probe waren also 4 Messungen notwendig, die nach folgender Formel in Beziehung gesetzt wurden und die endgültige Ratio (Lupus Ratio: LR) ergaben:

Ergebnis der gesamten Messung wird in Form eines Quotienten, der **Lupus-Ratio (LR)**, angegeben

Mischung 1:1 von Patienten-Plasma(PAT) und Normalplasma(NP)

Messung dieses Gemisches (PAT+NP) mit einem aPTT Reagenz mit **niedriger** Phospholipid-Konzentration (APTT-SP, IL)

Messung dieses Gemisches (PAT+NP) mit einem aPTT Reagenz mit **hoher** Phospholipid-Konzentration (SynthAFax, IL)

Messung des Normalplasmas (NP) mit einem aPTT Reagenz mit **niedriger** Phospholipid-Konzentration (APTT-SP, IL)

Messung des Normalplasmas (NP) mit einem aPTT Reagenz mit **hoher** Phospholipid-Konzentration (SynthAFax, IL)

$$LR = \frac{APTT-SP \text{ [sec] PAT+NP}}{SynthAFax \text{ [sec] PAT+NP}} : \frac{APTT-SP \text{ [sec] NP}}{SynthAFax \text{ [sec] NP}}$$

Abbildung 2.2: Formel der Ratio-Bildung des MixCon-LA

Probe

ID	Verdünnungsmedium	Volumen	Inkubation	Verdünnung	Inhalt	Stabilität
NP	Normalplasma	50 µl	0 sec.	1/2	3 ml	8h

Suchtest

	ID	Name	Inkubation	Volumen	Inhalt	Stabilität
1	aPTT	aPTT-SP	240 sec.	50 µl	5 ml	24h
2	Capoly	CaCl Polybrene		50 µl	10 ml	24h

Bestätigungstest

	ID	Name	Inkubation	Volumen	Inhalt	Stabilität
1	SynthAFax	PTT SynthAFax	240 sec.	50 µl	10 ml	24h
2	Capoly	CaCl Polybrene		50 µl	10 ml	24h

Testdaten

min. Messzeit:	20 sec.	Mischen:	Nein	Validierung
max. Messzeit:	240 sec.	Clot Typ:	Normal	min: 20.00 sec.
37° C:	Ja	Präzision:	5%	max: 150.00 sec.

Tabelle 2.2: Programm-Einstellungen des STA für die Durchführung des MixCon-LA.

2.4.2.2 Reproduzierbarkeit

Es wurde die Präzision mit Hilfe des Variationskoeffizienten (VK) für die Intra-assay und Inter-assay-Analytik berechnet. Für die Berechnung des VK des intra-assays wurden hierzu an 10 aufeinander folgenden Tagen pro Tag 10 mal hintereinander jeweils die selbe Probe eines Normalplasmas und 10 mal die selbe Probe eines pathologischen Lupus Kontrollplasmas gemessen. Für die Berechnung des VK des Inter-assays wurden entsprechend Normal- und Kontrollplasma an 10 verschiedenen Tagen gemessen.

2.4.2.3 Bestimmung des Grenzwertes

Es wurden willkürlich die ersten 99 Personen aus dem Blutspenderkollektiv an einem Tag gemessen und die resultierenden Messwerte mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft. Als Cutoff für die Lupus Ratio wurde der Mittelwert addiert mit der 2-fachen Standardabweichung gewählt.

2.4.2.4 Spezifität und Sensitivität

Um die Spezifität und Sensitivität des MixCon-LA zu überprüfen wurden 15 Patienten mit einem bekannten und klinisch gesicherten Antiphospholipid-Syndrom (APS) gemessen. Für die Berechnung der Spezifität wurde das Plasma der 10 heparinisierten und 19 marcumarisierten Patienten mit dem MixCon-LA-Test untersucht.

Zusätzlich wurde Plasma von 5 Patienten mit bekannter Hämophilie-A mittels des MixCon-LA-Tests untersucht.

2.4.3 Dilute Russell's Viper Venom Time (dRVVT)

Das Testprinzip des dRVVT-Tests beruht auf der Aktivierung des Faktor X zu Faktor Xa durch ein Enzym, welches im Schlangengift der „Vipera russelli“ enthalten ist. In Anwesenheit von Lupus-Antikoagulans wird die phospholipid-abhängige Aktivierung von Prothrombin durch den gebildeten Faktor Xa inhibiert. Dadurch kommt es zu einer verlangsamten Thrombinbildung und damit zu einer messbar verlängerten Gerinnungszeit. Der dRVVT-Test ist eine reproduzierbarer, sensitive und relativ spezifische Methode, um Lupus-Antikoagulans nachzuweisen (95 Thiagarajan P., 1986). Die Testergebnisse werden aufgrund der selektiven Aktivierung des Faktor X nicht von Hemmkörpern gegen die Faktoren VIII, IX und XI beeinflusst. Der im

Rahmen dieser Arbeit verwendete Testkit besteht aus zwei kommerziell erhältlichen Reagenzien, einem phospholipid-armen Suchtest (LAC-Screen) und einem Bestätigungstest (LAC-Confirm), bei dem Phospholipide im Überschuss vorhanden sind. Durch Mischen der zu untersuchenden Plasmaprobe mit Normalplasma werden dabei Faktorenmängel ausgeglichen. Somit sind pro untersuchter Plasmaprobe zwei Messungen nötig. Das Ergebnis wird in Form eines Quotienten dargestellt, indem das Resultat des LAC-Screen [sec] durch das Resultat des LAC-Confirm [sec] geteilt wird. Dieses Testverfahren wird in der Gerinnungsambulanz des Universitätsklinikums Frankfurt in der Laborroutine vollautomatisch durchgeführt. Es wird dabei der vom Hersteller empfohlene Normwert von 1,3 [Ratio] als Cutoff verwendet. Lediglich bei Patienten unter oraler Antikoagulation liegt der Normwert mit 1,6 [Ratio] höher, dies ist das Ergebnis einer im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten Normwertbestimmung für oral antikoagulierte Patienten. Hierbei wurde das Plasma von 20 Patienten unter oraler Antikoagulation, die kein bekanntes Antiphospholipid-Syndrom hatten, mittels des dRVVT-Tests untersucht und der Mittelwert in Addition der doppelten Standardabweichung als Normwert definiert. Die Anpassung des Cutoff bei diesem Patientenkollektiv war nötig, weil die Aktivität des Gerinnungsfaktors X unter einer Therapie mit oralen Antikoagulantien absinkt. Dies würde bei gleich bleibendem Cutoff zu falsch positiven Werten führen, da wie oben beschrieben, der dRVVT-Test auf der Aktivierung des Faktors X beruht.

2.4.4 PTT-Tauschtest

Der PTT-Tauschtest ist ein einfaches, nicht standardisiertes PTT-basierendes Testsystem, welches in dem Gerinnungslabor der Universitätsklinik Frankfurt zur Routinediagnostik des Lupus-Antikoagulans eingesetzt wurde und nach der Veröffentlichung der Ergebnisse dieser Arbeit durch den MixCon-LA ersetzt wurde. Als Suchtest diente ein phospholipid-armes und somit als lupussensitiv geltendes aPTT-Reagenz (aPTT-LT). Im Falle einer verlängerten PTT wurde manuell ein Bestätigungstest durchgeführt, bei dem das zu untersuchende Plasma mit Normalplasma in verschiedenen Verhältnissen (1+4, 1+1, 4+1) gemischt und die jeweilige Gerinnungszeit (PTT) gemessen wurde. Bei einem Defizit an Gerinnungsfaktoren wurde bereits in der 4+1-Mischung eine wieder normalisierte Gerinnungszeit erzielt. War jedoch ein höherer Anteil an Normalplasma für die Normalisierung der PTT notwendig, so war das ein starker Hinweis für das Vorhandensein von Lupusantikoagulantien.

2.4.5 ELISA-Immunoassays

2.4.5.1 Antikardiolipin

Antikardiolipin-Antikörper der Klassen IgG und IgM wurden bei dem Patientenkollektiv mit einem definitiven Antiphospholipid-Syndrom bestimmt. Dies geschah nicht im Rahmen dieser Arbeit, sondern während der klinischen Routine in der angiologischen Ambulanz der Universitätsklinik Frankfurt. Daher soll auch dieses Testprinzip im Folgenden erläutert werden. Es kam ein indirekter Enzymimmunoassay zum quantitativen Nachweis von Autoantikörpern (IgG und IgM) gegen Kardioprotein zum Einsatz. Die Kavitäten der Mikrotiterplatte sind mit bovinem Kardioprotein und humanem β_2 -Glykoprotein I als Kofaktor beschichtet. In einem ersten Reaktionsschritt werden die Antikörper in Standards, Kontrollen und Patientenproben an die immobilisierten Antigene in den Kavitäten gebunden. Es folgt ein zweiter Reaktionsschritt, in dem das zugegebene Enzymkonjugat spezifisch die gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe erkennt. In einem dritten Reaktionsschritt wird dann die optische Dichte der Proben in einem ELISA-Photometer bei 450 nm gemessen. Die Farbentwicklung ist direkt proportional zur gesuchten Autoantikörper-Konzentration. Die vom Hersteller empfohlenen Werte bis 10 [GPL-U/ml] für IgG bzw. 7 [MPL-U/ml] für IgM wurden als Cutoff definiert.

2.4.5.2 Anti- β_2 -Glykoprotein I

Neben Antikardiolipin-Antikörpern wurden bei dem Patientenkollektiv mit einem definitiven Antiphospholipid-Syndrom auch Anti- β_2 -Glykoprotein-I Antikörper der Klassen IgG und IgM bestimmt. Dies geschah ebenfalls während der klinischen Routine in der angiologischen Ambulanz der Universitätsklinik Frankfurt. Es kam ebenfalls ein indirekter Enzymimmunoassay zum Einsatz, dessen Kavitäten der Mikrotiterplatte mit humanem β_2 -Glykoprotein I beschichtet sind. Das Testprinzip gleicht dem der Antikardiolipin-Bestimmung (siehe 2.4.5.1, Seite 32), so dass es hier nicht erneut erläutert wird. Die vom Hersteller empfohlenen Werte bis 10 [GPL-U/ml] für IgG bzw. 10 [MPL-U/ml] für IgM wurden als Cutoff definiert.

2.4.6 APC-Resistenz

In den letzten Jahren wurde ein neuer Mechanismus für eine Thrombophilie beschrieben, bei dem die gerinnungshemmende Wirkung des aktivierten Protein C (APC) auf die Aktivität des Gerinnungsfaktor V herabgesetzt ist (96 Dahlback B., 1993). Unter physiologischen Bedingungen ist APC in der Lage, an einer bestimmten Stelle an den Faktor V zu binden und diesen durch Spaltung zu inaktivieren. Die Ursache der APC-Resistenz ist eine Mutation im Gen für den Gerinnungsfaktor V (Arg506Gln, FV Leiden) (97 Greengard J.S., 1994). Die Faktor-V-Leiden-Mutation, bei der in der Position 1691 des Gens ein Nucleotid (Guanin) gegen ein anderes (Adenin) ausgetauscht ist, hat den Austausch der 506. Aminosäure (Arginin durch Glutamin) zur Folge (98 Bertina R.M., 1994). Die Veränderung liegt genau in der Bindungsstelle für APC und beeinträchtigt die Spaltung und somit Inaktivierung des Faktor V.

Dennoch ist bei 10% der Patienten mit einer APC-Resistenz diese Mutation nicht nachweisbar (99 Zoller B., 1994). Unter der Annahme, dass auch bei diesen Patienten eine Störung der Inaktivierung des Faktor V für die APC-Resistenz ursächlich sein muss, konnte gezeigt werden, dass Antikörper, die sich gegen Phospholipide oder deren bindende Proteine richten, eine APC-Resistenz zur Folge haben können (100 Hampton K.K., 1994).

So können auch Lupusantikoagulantien für eine erworbene APC-Resistenz verantwortlich sein (101 Ehrenforth S., 1995). Aus diesem Grunde wurde bei den in dieser Arbeit untersuchten 15 Patienten mit einem Antiphospholipid-Syndrom auch das Vorliegen einer APC-Resistenz untersucht.

Das Vorliegen einer APC-Resistenz wurde mit einem Faktor V Mangelplasma gemessen. Zusätzlich wurde bei pathologischen Befunden eine Genanalytik für die Faktor V Leiden Mutation (G1691A) durchgeführt. Es kamen die in der Routine-Diagnostik des Universitätsklinikums Frankfurt verwendeten Methoden zum Einsatz.

3 Ergebnisse

3.1 Reproduzierbarkeit

3.1.1 Messungen im Vergleich innerhalb eines Tages (Intraassay)

Die folgenden Abbildungen 3.1 und 3.2 mit jeweils 10 Boxplots zeigen die Ergebnisse der Messungen im Tagesvergleich der jeweiligen 10 Normal- und pathologischen Kontrollplasmen an 10 verschiedenen Tagen. Pro Tag wurden jeweils 10 Proben eines Normalplasmas und 10 Proben einer pathologischen Lupus-Kontrolle gemessen. Die Messwerte entsprechen der berechneten Lupus-Ratio des MixCon-LA. Die entsprechende Formel ist unter 2.4.2 (siehe Seite 28) beschrieben.

Ein Boxplot ist folgendermaßen zu interpretieren:

Das Rechteck (Box) wird unten durch das 25%- und oben durch das 75%-Quantil begrenzt. Der Median ist in der Mitte der Box als waagerechte Linie eingezeichnet. Die so genannten Schnurrhaare (Whiskers) markieren zusätzlich noch unten das 10% und oben das 90%-Quantil.

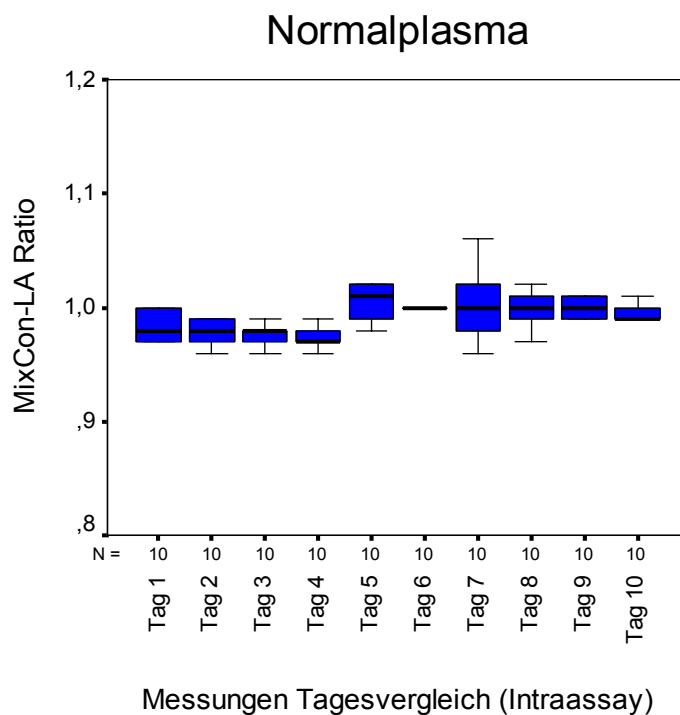


Abbildung 3.1: Die Messwerte der Messungen innerhalb eines Tages an 10 auf einander folgenden Tagen in Form von Boxplots. Pro Tag wurden 10 Proben eines Normalplasmas gemessen.

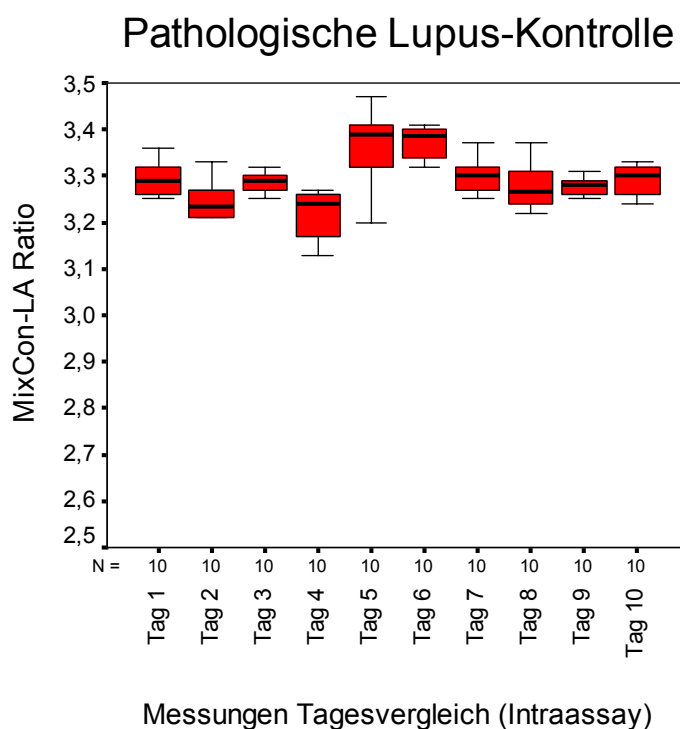


Abbildung 3.2: Die Messwerte der Messungen innerhalb eines Tages an 10 auf einander folgenden Tagen in Form von Boxplots. Pro Tag wurden 10 Proben einer pathologischen Lupus-Kontrolle gemessen.

3.1.2 Messungen im Tagesvergleich (Interassay)

Die folgenden 2 Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Messungen im Vergleich innerhalb der einzelnen Proben anhand der Darstellung als Boxplots. Es wurden 10 Proben eines Normalplasmas und 10 Proben einer pathologischen Lupus-Kontrolle an 10 verschiedenen Tagen jeweils ein Mal gemessen. Auf der Abszisse sind die jeweiligen Normalplasmen (N1-N10 in Abbildung 3.3) bzw. die pathologischen Kontrollplasmen (N1-N10 in Abbildung 3.4) aufgetragen. Die Messwerte entsprechen der berechneten Lupus-Ratio des MixCon-LA. Die entsprechende Formel ist unter 2.4.2 (siehe Seite 28) beschrieben.

Ein Boxplot ist folgendermaßen zu interpretieren:

Das Rechteck (Box) wird unten durch das 25% -und oben durch das 75%-Quantil begrenzt. Der Median ist in der Mitte der Box als waagerechte Linie eingezeichnet. Die so genannten Schnurrhaare (Whiskers) markieren zusätzlich noch unten das 10% und oben das 90%-Quantil.

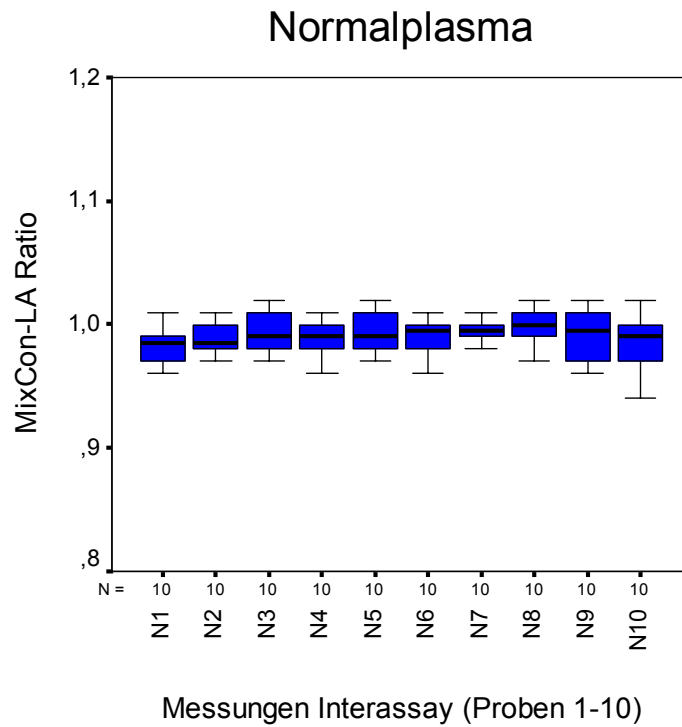


Abbildung 3.3: Die Messwerte innerhalb der einzelnen Normalplasmen (N1-N10) an 10 verschiedenen Tagen in Form von Boxplots.

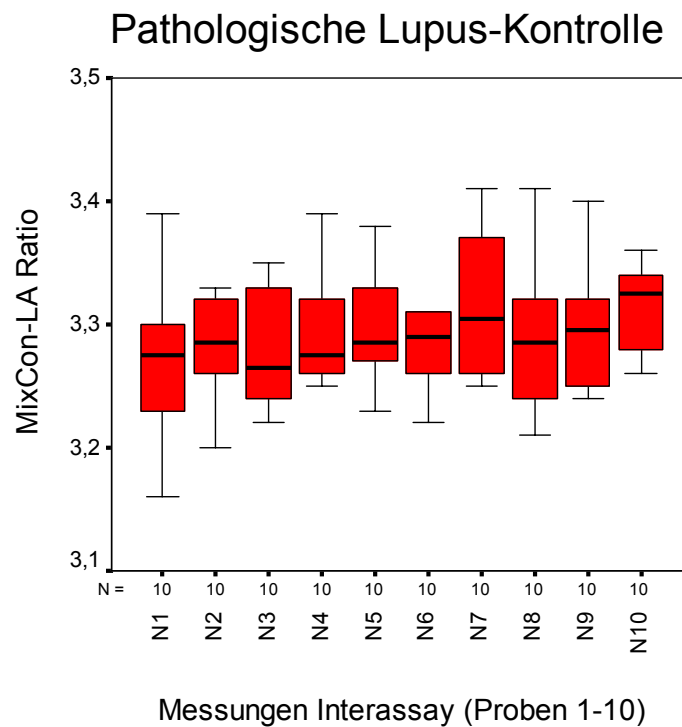


Abbildung 3.4: Die Messwerte innerhalb der einzelnen pathologischen Lupus-Kontrollen (N1-N10) an 10 verschiedenen Tagen in Form von Boxplots.

3.1.3 Variationskoeffizienten

Tabelle 3.1 zeigt die Ergebnisse der Berechnung der Variationskoeffizienten (VKs) des Intra- und Interassays. Die Messungen des Normalplasmas ergaben für den Intraassay eine Standardabweichung (SD) von 0,01 und einen VK von 1,5%, für den Interassay eine SD von 0,02 und einen VK von 1,9%. Die Messungen des pathologischen Kontrollplasmas ergaben für den Intraassay eine SD von 0,05 und einen VK von 1,5%, für den Interassay eine SD von 0,07 und einen VK von 2,0%. Dies sind exzellente Werte und zeigen eine hervorragende Reproduzierbarkeit des MixCon-LA Testes, was sicherlich durch die Ratio-Bildung bedingt ist.

Erwartungsgemäß lagen die Variationskoeffizienten in den Interassays etwas höher im Vergleich zum entsprechenden Intraassay. Darüber hinaus zeigten die Messwerte der pathologischen Lupus-Kontrolle eine größere Streuung im Vergleich zum Normalplasma.

	Normalplasma			Pathologische Lupus-Kontrolle		
	Mittelwert	Standard- Abweichung	Variations- Koeffizient (%)	Mittelwert	Standard- Abweichung	Variations- Koeffizient (%)
Intraassay n=10	0.99	0.01	1.5	3.29	0.05	1.5
Interassay n=10	0.99	0.02	1.9	3.29	0.07	2.0

Tabelle 3.1: Zusammenfassende Darstellung der Präzisionsdaten zur Reproduzierbarkeit des MixCon-LA-Tests.

3.1.4 Definition des Grenzwertes

Der Kolmogorov-Smirnov-Test bestätigte die Normalverteilung der 99 Messwerte der untersuchten Plasmen der Blutspender. Der Mittelwert der Lupus-Ratio betrug 1,01. Die Standardabweichung betrug 0,03. Der Grenzwert für ein pathologisches Plasma entspricht dem Mittelwert + 2 * Standardabweichung. Somit ergibt sich ein oberer Grenzwert für ein nicht pathologisches Plasma von 1,07. Tabelle 3.1 zeigt eine durch das Programm SPSS generierte Auswertung mit den Ergebnissen der Prüfung auf Normalverteilung. Der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest prüft die Nullhypothese, dass die einzelnen Werte *keiner* Normalverteilung folgen. Beträgt die asymptotische Signifikanz > 0,05, so kann die Nullhypothese verworfen werden, und es ist von einer Normalverteilung der Daten auszugehen. In diesem Fall spricht der Wert von $p=0,86$ für eine Normalverteilung.

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

		MixCon-LA
N		99
Parameter der Normalverteilung ^{a,b}	Mittelwert	1,0059
	Standardabweichung	3,292E-02
Extremste Differenzen	Absolut	,061
	Positiv	,055
	Negativ	-,061
Kolmogorov-Smirnov-Z		,603
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		,860

- a. Die zu testende Verteilung ist eine Normalverteilung.
 b. Aus den Daten berechnet.

Table 3.2: Ergebnis der Prüfung auf Normalverteilung der Messwerte des MixCon-LA der 99 untersuchten Blutspender.

3.2 Spezifität und Sensitivität

Alle Patienten mit einem APS (15/15) hatten ein positives Ergebnis in dem dRVVT-Test, während 11/15 Patienten ein positives Resultat in dem aPTT-Tauschtest aufwiesen, welcher routinemäßig im Labor des Institutes durchgeführt wird. Die Resultate für die Antikardiolipin-Antikörper variierten stark zwischen den einzelnen Patienten sowohl für das IgM als auch für das IgG, so dass von einer heterogenen Gruppe dieser Antikörper bei den Patienten auszugehen ist. Bei fünf von zwölf (5/12) Patienten lag eine pathologische APC-Resistenz vor, bei allen dieser fünf Patienten lag keine Mutation im Faktor-V-Gen vor. Tabelle 3.3 stellt eine zusammenfassende Übersicht der laborchemischen Daten der untersuchten 15 Patienten dar. Bei 13/15 Patienten ergab der MixCon-LA-Test ein positives Ergebnis, während 2/15 ein negatives Ergebnis aufwiesen. Somit ergibt sich eine Sensitivität von 87% (siehe hierzu Tabelle 3.7). Bei allen 5 Patienten mit erworbener APC-Resistenz lag die LR beim MixCon-LA-Test >1.4 .

Sowohl alle heparinisierten (10/10) als auch alle marcumarisierten Patienten (19/19) wiesen ein negatives Testergebnis auf. Somit ergibt sich eine Spezifität bezüglich der Kontamination des Plasmas mit Heparin oder oralen Antikoagulantien von 100%. Die einzelnen Messwerte dieser beiden Patientengruppen sind in den Tabellen 3.4 (siehe Seite 41) und 3.5 (siehe Seite 42) aufgelistet.

Bei den Patienten mit bekannter Hämophilie A wiesen 4/5 Patienten ein negatives Resultat auf, während einzig ein Patient (1/5), welcher einen Faktor VIII-Inhibitor entwickelt hatte, ein schwach positives Ergebnis lieferte. Tabelle 3.6 zeigt die einzelnen Messwerte dieser 5 Patienten (siehe Seite 43).

Die Ergebnisse der Überprüfung der Spezifität und Sensitivität aller erwähnten Patientengruppen sind in Tabelle 3.7 (siehe Seite 45) zusammenfassend dargestellt.

Patienten- Nummer	Lupus-Antikoagulans			Antikardiolipin		APC-Resistenz *
	dRVVT Pos./Neg.	PTT- Tausch- Test Pos./Neg.	<i>MixCon-LA</i> (<i><1.07</i>)	IgM U/ml (<i><8</i>)	IgG U/ml (<i>< 10</i>)	(<i><2.0</i>)
1	Pos.	Pos.	1,20	12,8	>120	2,2
2	Pos.	Pos.	2,48	4,0	>120	1.4*
3	Pos.	Neg.	1,40	8,8	>120	1.8*
4	Pos.	nm	2,83	15,2	8,6	n.u.
5	Pos.	Pos.	1,40	2,6	4,3	2,6
6	Pos.	Pos.	1,21	13,7	21,5	2,6
7	Pos.	Pos.	2,24	18,1	>120	1.6*
8	Pos.	Pos.	1,35	70.5	>120	n.u.
9	Pos.	Pos.	<i>0,98</i>	2,9	5,2	2,4
10	Pos.	Neg.	<i>1,03</i>	17,4	80,1	2,1
11	Pos.	Pos.	2,31	1,4	>120	1.9*
12	Pos.	Neg.	1,08	13.8	2,6	2,3
13	Pos.	Pos.	1,67	18,7	9,8	n.u.
14	Pos.	Pos.	1,78	27,3	8,5	2,0
15	Pos.	Pos.	1,72	12,4	>120	1.7*

Tabelle 3.3: Laborchemische Daten der 15 Patienten mit einem Vollbild des Antiphospholipid-Syndroms. Fett gedruckte Werte zeigen ein positives Testergebnis. * APC-Resistenz gemessen mit Faktor V Mangelplasma, alle Patienten waren negativ für die Faktor V Leiden Mutation (G1691A).

n.u.: nicht untersucht

Patienten- Nummer	MixCon-LA Einzelmessungen bei 19 Patienten unter oraler Antikoagulation				MixCon-LA Ratio *
	PAT+NP (a) Screen & Mix [sec]	PAT+NP (b) Confirm [sec]	NP (c) [sec]	NP (d) [sec]	LR (a/b) / (c/d)
1	30,9	28,2	34,2	30,1	0,96
2	36,7	34,6	34,2	30,1	0,93
3	32,8	30,0	34,2	30,1	0,96
4	33,8	29,3	34,2	30,1	1,02
5	35,3	32,4	34,2	30,1	0,96
6	34,3	30,6	34,2	30,1	0,99
7	37,7	34,1	34,2	30,1	0,97
8	35,0	31,8	34,2	30,1	0,97
9	32,9	30,4	34,2	30,1	0,95
10	34,4	31,8	34,2	30,1	0,95
11	36,4	32,0	34,2	30,1	1,00
12	32,0	29,1	34,2	30,1	0,97
13	34,4	31,3	34,2	30,1	0,97
14	36,8	31,5	34,2	30,1	1,03
15	33,2	31,8	34,2	30,1	0,92
16	32,5	30,5	34,2	30,1	0,94
17	34,7	31,8	34,2	30,1	0,96
18	32,2	30,2	34,2	30,1	0,94
19	29,9	27,8	34,2	30,1	0,95

Tabelle 3.4: Laborchemische Daten der 19 Patienten unter oraler Antikoagulation bei einer INR zwischen 1,8 – 3,2. **PAT+NP (a):** Messung eines 1:1 Gemisches aus Patientenplasma (PAT) und Normalplasma (NP) mit einem aPTT-Reagenz mit *niedriger* Phospholipid-Konzentration (APTT-SP, IL). Diese Messung beinhaltet einem Suchtest (Screen) und einen Mischtest (Mixing); **PAT+NP (b):** Messung eines 1:1 Gemisches aus Patientenplasma (PAT) und Normalplasma (NP) mit einem aPTT-Reagenz mit *hoher* Phospholipid-Konzentration (SynthAFax, IL). Diese Messung entspricht einem Bestätigungstest (Confirm); **NP (c):** Messung des Normalplasmas (NP) mit einem aPTT-Reagenz mit *niedriger* Phospholipid-Konzentration (APTT-SP, IL). **NP (d):** Messung des Normalplasmas (NP) mit einem aPTT-Reagenz mit *hoher* Phospholipid-Konzentration (APTT-SP, IL). **LR:** Ergebnis der gesamten Messung in Form eines Quotienten, der Lupus-Ratio. Eine detaillierte Beschreibung dieser Formel ist unter 2.4.2 (siehe Seite 28) zu finden.

Patienten- Nummer	MixCon-LA Einzelmessungen bei 10 Patienten unter Heparintherapie				MixCon-LA Ratio *
	PAT+NP (a) Screen & Mix [sec]	PAT+NP (b) Confirm [sec]	NP (c) [sec]	NP (d) [sec]	LR (a/b) / (c/d)
1	34,0	33,1	34,2	30,1	0,90
2	36,1	33,0	34,2	30,1	0,96
3	33,6	30,1	34,2	30,1	0,98
4	31,5	27,8	34,2	30,1	1,00
5	36,9	32,8	34,2	30,1	0,99
6	35,5	31,4	34,2	30,1	1,00
7	36,8	31,8	34,2	30,1	1,02
8	38,9	37,2	34,2	30,1	0,92
9	38,5	39,0	34,2	30,1	0,87
10	41,0	35,3	34,2	30,1	1,02

Tabelle 3.5: Laborchemische Daten der 10 Patienten mit intravenöser Gabe von unfraktioniertem Heparin. Alle 10 Patienten wiesen eine 1,5 – 2,5-fache Verlängerung der PTT auf und lagen somit im therapeutischen Bereich. **PAT+NP (a):** Messung eines 1:1 Gemisches aus Patientenplasma (PAT) und Normalplasma (NP) mit einem aPTT-Reagenz mit *niedriger* Phospholipid-Konzentration (APTT-SP, IL). Diese Messung beinhaltet einem Suchtest (Screen) und einen Mischtest (Mixing); **PAT+NP (b):** Messung eines 1:1 Gemisches aus Patientenplasma (PAT) und Normalplasma (NP) mit einem aPTT-Reagenz mit *hoher* Phospholipid-Konzentration (SynthAFax, IL). Diese Messung entspricht einem Bestätigungstest (Confirm); **NP (c):** Messung des Normalplasmas (NP) mit einem aPTT-Reagenz mit *niedriger* Phospholipid-Konzentration (APTT-SP, IL). **NP (d):** Messung des Normalplasmas (NP) mit einem aPTT-Reagenz mit *hoher* Phospholipid-Konzentration (APTT-SP, IL). **LR:** Ergebnis der gesamten Messung in Form eines Quotienten, der Lupus-Ratio. Eine detaillierte Beschreibung dieser Formel ist unter 2.4.2 (siehe Seite 28) zu finden.

Patienten- Nummer	MixCon-LA Einzelmessungen bei 5 Patienten mit Hämophilie A				MixCon-LA Ratio *
	PAT+NP (a) Screen & Mix [sec]	PAT+NP (b) Confirm [sec]	NP (c) [sec]	NP (d) [sec]	LR (a/b) / (c/d)
1*	46,4	35,4	34,2	30,1	1,2 *
2	37,3	35,4	34,2	30,1	0,9
3	40,8	36,9	34,2	30,1	1,0
4	40,1	34,4	34,2	30,1	1,0
5	41	36,8	34,2	30,1	1,0

Tabelle 3.6: Laborchemische Daten der 5 Patienten mit nachgewiesener Hämophilie A. Alle 5 Patienten wiesen eine Restaktivität des Faktor VIII < 8% auf. **PAT+NP (a)**: Messung eines 1:1 Gemisches aus Patientenplasma (PAT) und Normalplasma (NP) mit einem aPTT-Reagenz mit *niedriger* Phospholipid-Konzentration (APTT-SP, IL). Diese Messung beinhaltet einem Suchtest (Screen) und einen Mischtest (Mixing); **PAT+NP (b)**: Messung eines 1:1 Gemisches aus Patientenplasma (PAT) und Normalplasma (NP) mit einem aPTT-Reagenz mit *hoher* Phospholipid-Konzentration (SynthAFax, IL). Diese Messung entspricht einem Bestätigungstest (Confirm); **NP (c)**: Messung des Normalplasmas (NP) mit einem aPTT-Reagenz mit *niedriger* Phospholipid-Konzentration (APTT-SP, IL). **NP (d)**: Messung des Normalplasmas (NP) mit einem aPTT-Reagenz mit *hoher* Phospholipid-Konzentration (APTT-SP, IL). **LR**: Ergebnis der gesamten Messung in Form eines Quotienten, der Lupus-Ratio. Eine detaillierte Beschreibung dieser Formel ist unter 2.4.2 (siehe Seite 28) zu finden.

*: Plasma enthielt einem Faktor VIII-Inhibitor und war als einzige Probe der 5 untersuchten Patienten mit Hämophilie A schwach positiv. Siehe dazu Punkt 4.1 (Seite 48) im Diskussions-Teil.

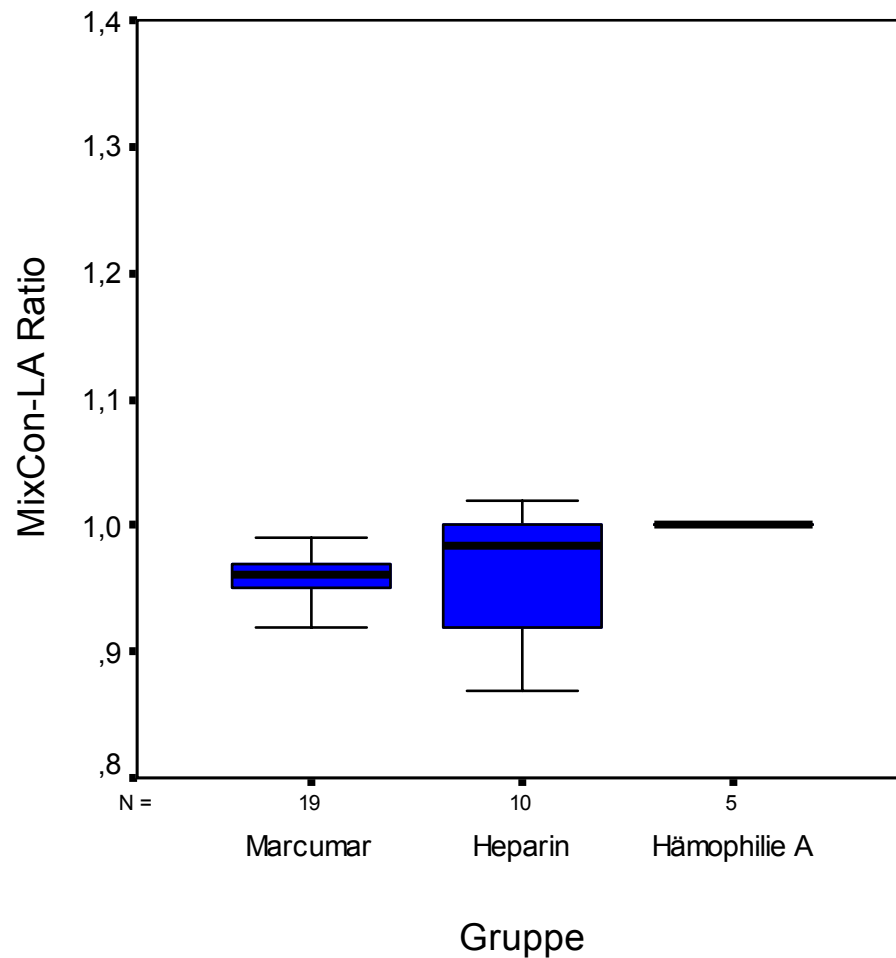


Abbildung 3.5: Zusammenfassende Darstellung der Messwerte in Form von Boxplots der 19 Patienten unter oraler Antikoagulation, 10 Patienten mit intravenöser Gabe von unfraktioniertem Heparin und 5 Patienten mit Hämophilie A. Das Rechteck (Box) wird unten durch das 25%- und oben durch das 75%-Quantil begrenzt. Der Median ist in der Mitte der Box als waagerechte Linie eingezeichnet. Die so genannten Schnurrhaare (Whiskers) markieren zusätzlich noch unten das 10% und oben das 90%-Quantil.

	Anzahl der Patienten	MIXCON- LA Positive	MIXCON- LA Negative	Spezifität %	Sensitivität %
Intravenöses unfraktioniertes Heparin	10	0	10	100	–
Orale Antikoagulation	19	0	19	100	–
Hämophilie A	5	1*	4	80	–
Antiphospholipid- Syndrom	15	13	2	–	87

Tabelle 3.7: Zusammenfassende Darstellung der Spezifität und Sensitivität des MixCon-LA Tests.

*: ein Plasma mit einem Faktor VIII-Inhibitor war schwach positiv (Lupus-Ratio: 1.15)

4 Diskussion

4.1 Beurteilung der Testergebnisse

Es ist berechtigt zu fragen, weshalb es sinnvoll war, einen weiteren Test zur Erfassung des Lupus Antikoagulans zu entwickeln.

Bisher erfolgte keine Standardisierung der Testverfahren auf nationaler und internationaler Ebene. Für Laboratorien, welche nicht aktiv in die Lupus-Antikoagulans Forschung involviert sind, ist es weiterhin eine große Herausforderung, einfach zu handhabende und ökonomische Testverfahren zu etablieren. Und dies obwohl zahlreiche kommerzielle Tests inzwischen erhältlich sind. Ein wichtiger Grund dafür ist die suboptimale Genauigkeit dieser Tests. In einigen Multicenter-Studien konnte anhand der Untersuchung verschiedener kommerziell erhältlicher Testsysteme gezeigt werden, dass in der Labordiagnostik des APS erhebliche Schwankungen bezüglich Reproduzierbarkeit, Genauigkeit, Sensitivität und Spezifität vorliegen. Ein Grund für die Variabilität ist die mangelnde Vergleichbarkeit der Resultate wegen der Benutzung verschiedener Reagenzien und Messinstrumente (102 Jennings I., 1997), (103 Arnout J., 1999), (104 Lawrie A.S., 1999). Daher ist die Entwicklung von Testsystemen, die es erlauben, Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboratorien zu vergleichen, dringend nötig. Der aPTT-basierte Lupus-Ratio-Test beinhaltet einen Mischtest und Bestätigungstest in einem einzelnen Testsystem und weist eine hohe Vergleichbarkeit der Testergebnisse zwischen verschiedenen Labors bezüglich des Vorhandenseins oder der Abwesenheit des Lupus-Antikoagulans auf (94 Schjetlein R., 1993).

Der in dieser Arbeit entwickelte MixCon-LA-Test basiert auf dem im Vorfeld beschriebenen Lupus-Ratio-Test und kann mit kommerziell erhältlichen Reagenzien durchgeführt werden. Der Algorithmus des MixCon-LA Test kann auf einfache Art und Weise auf jedem Gerinnungs-Testautomaten programmiert werden. Bei der Durchführung der einzelnen Tests wurde das zu untersuchende Plasma mit Normalplasma in einem Verhältnis von 1:1 gemischt, um etwaige Mängel an physiologischen Gerinnungsfaktoren zu kompensieren. Somit wurde eine 100%-ige Spezifität erreicht, wenn Patienten mit erworbenen Mängeln an Gerinnungsfaktoren infolge der Einnahme von oralen Antikoagulantien oder Patienten mit angeborenen

Mängeln an Gerinnungsfaktoren wie zum Beispiel der Hämophilie A untersucht wurden. Lediglich erworbene Faktor VIII-Inhibitoren können das Testsystem beeinflussen (105 Taher A., 2003). So hatte in dieser Arbeit ein Patient mit bekannter Hämophilie A mit einem Faktor VIII-Inhibitor ein falsch positives Testergebnis in dem MixCon-LA-Test.

Aufgrund der Tatsache, dass in diesem Testsystem zusätzlich eine spezielle Calciumchlorid-Lösung verwendet wurde, welches Polybrene enthält, wurden die Messwerte nicht von einer systemischen Heparinabgabe beeinflusst. Polybrene ist ein Heparinantagonist, so dass Heparin das Testsystem nicht stört. Dies war bis dato in den meisten anderen Testsystemen zur Erfassung des Lupus Antikoagulans der Fall (94 Schjetlein R., 1993), da die handelsüblichen Calciumchlorid-Lösungen diesen Zusatz nicht enthalten.

Ein großes Problem bei der Labordiagnostik der Antiphospholipid Antikörper ist die Heterogenität dieser Antikörper, was eine Variabilität in den einzelnen Gerinnungstest-basierten Testsystemen zur Folge hat. Daher sollten bei der Labordiagnostik des Lupus Antikoagulans auch weiterhin mindestens zwei Gerinnungstest-basierte Testsysteme zum Screening, sowie für Misch- und Bestätigungsverfahren, zur Anwendung kommen. Ein einzelner Test ist nicht in der Lage ist, eine 100%-ige Sensitivität zu gewährleisten (106 Greaves M., 1999).

Vergleicht man nun den MixCon-LA mit dem zurzeit routinemäßig eingesetzten aPTT-Tauschtest, so zeigt der MixCon-LA-Test eine höhere Sensitivität bezüglich der Diagnostik des Lupus Antikoagulans. Dies könnte durch die Tatsache erklärt werden, dass ein aPTT-Reagenz, welches im MixCon-LA-Test zum Einsatz kommt, reich an Phosphatidylethanolamin ist. Phosphatidylethanolamin ist bekanntermaßen das wichtigste Phospholipid für die gerinnungshemmende Funktion im Protein C Komplex (107 Esmon N.L., 2000). Eine Untergruppe von Antiphospholipid-Antikörpern, welche das Antiphospholipid-Syndrom induzieren, könnte direkt gegen Phosphatidylethanolamin gerichtet sein und so zu einer erworbenen Resistenz gegen aktiviertes Protein C führen (100 Hampton K.K., 1994). Diese erworbene Resistenz gegen aktiviertes Protein C könnte für die thromboembolischen Komplikationen im Rahmen eines Antiphospholipid-Syndroms mitverantwortlich sein.

Der in dieser Arbeit entwickelte Test könnte somit helfen, partiell diese relevanten Autoantikörper zu erfassen.

4.2 Normwertbestimmung

Die entscheidende Frage bei vielen Laborbestimmungen lautet: „Was ist normal ?“. Es gibt gewisse Fragestellungen, die präzise mit „Ja“ oder „Nein“ beantwortet werden können und müssen. So lässt zum Beispiel der Nachweis von Antikörpern gegen das Human Immunodeficiency Virus (HIV) den Schluss zu, dass der entsprechende Patient Kontakt mit diesem Erreger hatte. Unter der Voraussetzung, dass die verwendete Labormethode eine ausreichende Sensitivität und Spezifität besitzt, lässt sich die untersuchte Blutprobe eindeutig als „Antikörper positiv“ oder „Antikörper negativ“ bezeichnen. Anhand eines solchen Befundes lässt sich dann entsprechend sinnvoll die weitere Diagnostik und Therapie planen. Ein Nachweis hat somit unabhängig vom Titer einen pathologischen Wert und dementsprechend therapeutische Konsequenzen.

Weitaus schwieriger verhält sich die Sache, wenn es um den Nachweis von Antikörpern geht, die durch Autoimmunprozesse induziert werden und deren genauer Krankheitswert nicht hinreichend geklärt ist. In diesem Fall genügt nicht nur der Nachweis, sondern es muss genau überlegt werden, ab welcher Höhe ein Laborwert als pathologisch eingestuft wird.

Genau diese Problematik findet sich bei der Bestimmung des Lupus-Antikoagulans. Erschwerend kommt hinzu, dass ca. 5% der Personen in der gesunden Normalbevölkerung einen niedrigtitrigen Antikörper aufweisen (108 Shi W., 1990). Die Festlegung auf einen Normwert kann deshalb nur mit einer gewissen Unschärfe erfolgen. Es gibt in diesem Fall grundsätzlich zwei verschiedene Methoden, willkürlich einen Normbereich zu bestimmen. Zum einen über die Festlegung des Wertes anhand einer Perzentilen oder anhand des Mittelwertes mit Addition einer oder mehrfacher Standardabweichungen. Die Messwerte der als Referenz zugrunde liegenden 99 Blutspender wiesen beim MixCon-LA eine Normalverteilung nach Gauß auf, so dass folglich die Standardabweichung gewählt wurde. Die Grenze für den Normwert anhand von Perzentilen festzulegen, würde man nur im Falle einer nicht erfüllten Normalverteilung vornehmen. Somit lässt sich Unsicherheit bei der Interpretation der Messwerte auch bei dem MixCon-LA nicht vermeiden, diese liegt aber in der Natur der Normwertbestimmung.

4.3 Sensitivität und Spezifität

Eine große Schwierigkeit bei der Bestimmung von Antiphospholipid-Antikörpern ist die Heterogenität dieser Antikörper-Familie. Da zur Zeit auch kein internationaler Standard für die Diagnostik der Lupusantikoagulantien existiert, an dem die Frage nach der Sensitivität und Spezifität untersucht werden könnte, musste die Beantwortung dieser Frage ohne einen verfügbaren Goldstandard erfolgen. Theoretisch müssten alle *direkt* nachweisbaren Antikörper (z.B. Antikardiolipin) auch von einer *indirekten* Nachweismethode, so wie sie dem Lupus-Antikoagulans Phänomen zugrunde liegt, erfasst werden. Unter der Annahme, dass Antiphospholipid-Antikörper in-vitro eine Verlängerung der Gerinnungszeit bewirken, müssten diese somit stets eine Verlängerung der PTT zur Folge haben. Dies ist in der Praxis jedoch nicht immer der Fall, wodurch die Diagnostik dieser Antikörper erschwert wird.

In diesem Zusammenhang ist bereits bekannt, dass die von verschiedenen Herstellern angebotenen aPTT-Reagenzien eine unterschiedliche Sensitivität haben (109 Denis-Magdelaine A., 1995). Bei einer vergleichenden Untersuchung von 16 verschiedenen aPTT-Reagenzien an 40 Patienten, welche im Vorfeld schon einmal für das Lupus-Antikoagulans positiv getestet wurden, lag der Variations-Koeffizient zwischen 1,9 und 7,9%, die Sensitivität für Lupus-Antikoagulans positive Plasmen variierte von 77,5 bis 100%. Unter den Reagenzien, die eine 100% Sensitivität aufwiesen (6/16), war eines dabei, das bei der Untersuchung von Normalplasmen in 2.2% der Fälle ein falsch positives Ergebnis lieferte. Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse muss kritisch angemerkt werden, dass lediglich 9/40 Patienten dieser Studie eine für das Antiphospholipid-Syndrom typische Klinik boten und die Auswahl der Lupus-Antikoagulans positiven Plasmen lediglich auf der Basis einer abnormal verlängerten aPTT erfolgte.

Diese diagnostische Unschärfe belegen zum einen das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv mit einem definitiven APS, bei dem die Patienten zwar alle in mindestens zwei Tests auf Antiphospholipid-Antikörper reagierten, die Ergebnisse aber keinem einheitlichen Muster folgten. Zum anderen zeigte eine Studie an 584 konsekutiven Patienten (110 Proven A., 2004) unter anderem, dass bei 137/584

Patienten, die entweder positiv auf Antikardiolipin-Antikörper oder Lupus-Antikoagulans getestet wurden, lediglich 48% in beiden Testsystemen positiv waren. Bei 76/137 Patient wurde das Lupus-Antikoagulans mittels vier verschiedener Nachweismethoden (aPTT, plasma clotting time, kaolin clotting time, dRVVT) gefunden, wobei hierbei lediglich 21/76 Patienten in allen vier Testen positiv reagierten. Diese Ergebnisse belegen die Heterogenität dieser Antikörper und die damit verbundenen diagnostischen Schwierigkeiten.

Bei der Evaluierung des in dieser Arbeit vorgestellten Testsystems wurde dementsprechend als „Goldstandard“ die klinische Diagnose eines Antiphospholipid-Syndroms nach den internationalen Kriterien gewählt, bei denen neben eines gesicherten Nachweises einer thromboembolischen Komplikation oder/und rezidivierenden Aborten, der wiederholte laborchemische Nachweis von Antiphospholipid-Antikörpern anhand zwei methodisch unterschiedlicher Testverfahren gefordert wird. Somit konnte sichergestellt werden, dass alle untersuchten Patienten ein Vollbild des Antiphospholipid-Syndroms aufwiesen und dementsprechend mindestens eine Untergruppe von Antiphospholipid-Antikörpern besitzen. Die Untersuchung der Sensitivität und Spezifität zielte somit nicht auf einen bestimmten laborchemisch nachweisbaren Typ der Antiphospholipid-Antikörper, sondern inwieweit durch den indirekten Nachweis mittels Testung auf das Lupus-Antikoagulans die Gesamtheit der heterogenen Antikörper bei diesen Patienten nachgewiesen werden konnte. Das Resultat von 87% positiv getesteten Patienten mit einem definitiven APS belegt somit, dass der MixCon-LA unabhängig davon, in welchem Test die Antikörper bei der Diagnose der APS entdeckt wurden, in der Lage ist, diese zu einem Großteil zu erfassen.

Bei genauer Betrachtung der 15 Patienten mit definitivem APS ist auffällig, dass alle 15 Patienten ein positives Resultat im dRVVT-Test zeigen. Diese Tatsache lässt folglich zwei Fragen aufkommen: 1.) Reicht es nicht aus, den dRVVT allein als Test für das Lupus Antikoagulans zu verwenden ? 2.) Ist dieser Test somit nicht geeigneter für die Bestimmung des Lupus-Antikoagulans als der MixCon-LA-Test ?

Die kleine Fallzahl von 15 Patienten in dieser Arbeit erklärt am ehesten das positive Ergebnis. Der dRVVT-Test wird aufgrund seiner guten Sensitivität in vielen Labors

als Bestimmungsmethode für das Lupus Antikoagulans verwendet. Allerdings erreicht auch dieser Test in größeren Kollektiven keine 100%-ige Sensitivität. Darüber hinaus besitzt der dRVVT-Test als größten Nachteil, dass er empfindlich gegenüber der Einnahme oraler Antikoagulantien ist und die Normbereiche dann dementsprechend angepasst werden müssen. Folglich sind der dRVVT-Test und der MixCon-LA nicht als konkurrierende Methoden anzusehen, sondern sollten vielmehr ergänzend eingesetzt werden, um so ein Höchstmaß an Sensitivität zu erreichen

4.4 Zusammenfassung

Das Lupus-Antikoagulans ist mit einem deutlich erhöhten Risiko für arterielle und venöse Thrombosen assoziiert, so dass ihr Nachweis im Labor von großer klinischer Relevanz ist. Bei den meisten bisher verfügbaren Testsystemen sind Sensitivität und Präzision häufig unbefriedigend, und es kann zu falsch positiven Testergebnissen durch Heparin oder orale Antikoagulantien kommen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, einen präzisen, sensitiven und spezifischen Test zum optimierten Nachweis des Lupus-Antikoagulans zu entwickeln. Hierzu wurde ein auf der aPTT basierendes vollautomatisches Testprinzip entwickelt, bei dem Mischungen eines lupussensitiven und eines lupusinsensitiven aPTT-Reagenzes mit Patientenplasma oder Normalplasma hergestellt wurden. Die Ergebnisangabe erfolgte in Form einer Ratio, bei der jeweils die beiden Ratios des Patienten- und Normalplasmas nochmals in Relation gesetzt werden.

Es wurden 99 Blutspender, 10 Patienten unter einer intravenösen, therapeutischen Behandlung mit unfraktioniertem Heparin, 19 oral antikoagulierte Patienten, sowie 5 Patienten mit Hämophilie A und 15 Patienten mit Antiphospholipid-Syndrom mit dem neuen Testsystem untersucht.

Für die Präzision innerhalb einer Messreihe und von Tag zu Tag ergaben sich Varianzkoeffizienten von 1,5 – 1,9%. Der Mittelwert \pm 2SD der Ratio lag für die 99 Blutspender bei 1,07 und diente als Cutoff. Ein negatives Testergebnis zeigten alle mit Heparin oder oralen Antikoagulantien behandelten Patienten (Spezifität: 100%), 1/5 Patienten mit Hämophilie A reagierte positiv (80%), dieser hatte jedoch eine Faktor VIII Hemmkörper entwickelt. Von den 15 Patienten mit einem definitiven Antiphospholipid-Syndrom wiesen 13 eine erhöhte Ratio auf (Sensitivität: 87%).

Somit ermöglicht dieses neu entwickelte Testsystem vollautomatisch einen präzisen, sensitiven und spezifischen Nachweis des Lupus-Antikoagulans.

5 Literaturverzeichnis

1. Pangborn MC.

A new serologically active phospholipid from beef heart

Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (1941) 48:484-486

2. Moore J.E.

Biologically false positive serologic test for syphilis

JAMA (1952) 150:467-473

3. Vaarala O., Palosuo T., Kleemola M., Aho K.

Anticardiolipin response in acute infections

Clinical Immunology and Immunopathology (1986) 41:8-15

4. Moore J.E.

The natural history of systemic lupus erythematosus: an approach to its study through chronic biologic false positive reactors

J Chron Dis (1955) 1:297-316

5. Müller J.F.

Observations on the characteristics of an unusual circulating anticoagulant

Lab Clin Med (1951) 38:254-261

6. Triplett D.A. und Brandt J.

Laboratory identification of the lupus anticoagulant

Br.J Haematol. (1989) 73:139-142

7. Feinstein D.I. und Rapaport S.I.

Acquired inhibitors of blood coagulation

Progress in Hemostasis and Thrombosis (1972) 1:75-95

8. Frick P.G.

Acquired circulating anticoagulants in systemic "collagen disease"

Blood (1955) 10:691-706

9. Bick R.L.

Antiphospholipid thrombosis syndromes

Clin.Appl.Thromb.Hemost. (2001) 7:241-258

10. Triplett D.A.

Antiphospholipid antibodies

Arch.Pathol.Lab Med. (2002) 126:1424-1429

11. Gastineau D.A., Kazmier F.J., Nichols W.L., Bowie E.J.

Lupus anticoagulant: an analysis of the clinical and laboratory features of 219 cases

American Journal of Hematology (1985) 19:265-275

12. Lechner K. und Pabinger-Fasching I.

Lupus anticoagulants and thrombosis. A study of 25 cases and review of the literature

Haemostasis (1985) 15:254-262

13. Pazner R., Rosner E., Many A.

Circulating anticoagulant in systemic lupus erythematosus: clinical manifestations

Acta Haematologica (1986) 76:90-94

14. Nilsson I.M., Astedt B., Hedner U., Berezin D.

Intrauterine death and circulating anticoagulant ("antithromboplastin")

Acta Medica Scandinavica (1975) 197:153-159

15. Wilson W.A., Gharavi A.E., Koike T., Lockshin M.D., Branch D.W., Piette J.C., Brey R., Derksen R., Harris E.N., Hughes G.R., Triplett D.A., Khamashta M.A.

International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop

Arthritis and Rheumatism (1999) 42:1309-1311

16. Arnout J.

Scientific Standardisation Subcommittee Lupus Anticoagulants/Phospholipid dependent antibodies.

International Society of Thrombosis and Haemostasis, Boston (2002)

17. Bick R.L. und Baker W.F.

Antiphospholipid syndrome and thrombosis

Seminars in Thrombosis and Hemostasis (1999) 25:333-350

18. Bick R.L., Arun B., Frenkel E.P.

Antiphospholipid-thrombosis syndromes

Haemostasis (1999) 29:100-110

19. Sheng Y., Kandiah D.A., Krilis S.A.

Beta2-glycoprotein I: target antigen for 'antiphospholipid' antibodies. Immunological and molecular aspects

Lupus (1998) 7 Suppl 2:S5-S9

20. McNeil H.P., Hunt J.E., Krilis S.A.

New aspects of anticardiolipin antibodies

Clin Exp.Rheumatol. (1990) 8:525-527

21. Triplett D.A.

Laboratory diagnosis of lupus anticoagulants

Seminars in Thrombosis and Hemostasis (1990) 16:182-192

22. Hamsten A., Walldius G., Szamosi A., Dahlen G., de Faire U.

Relationship of angiographically defined coronary artery disease to serum lipoproteins and apolipoproteins in young survivors of myocardial infarction

Circulation (1986) 73:1097-1110

23. Harris E.N., Gharavi A.E., Asherson R.A., Boey M.L., Hughes G.R.

Cerebral infarction in systemic lupus: association with anticardiolipin antibodies

Clinical and Experimental Rheumatology (1984) 2:47-51

24. Font J., Cervera R., Lopez-Soto A., Pallares L., Bosch X., Ampurdanes S., Casals F.J., Ingelmo M.

Anticardiolipin antibodies in patients with autoimmune diseases: isotype distribution and clinical associations

Clinical Rheumatology (1989) 8:475-483

25. Tada K., Akamatsu K., Konno T., Ohuchi T., Ohkubo K., Hayama K., Yamamoto S., Wakabayashi T., Ohta Y.

Clinical significance of antiphospholipid antibodies in fulminant hepatic failure

Hepatology (1995) 42:27-30

26. McNeil H.P., Simpson R.J., Chesterman C.N., Krilis S.A.

Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2- glycoprotein I (apolipoprotein H)

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (1990) 87:4120-4124

27. Bouma B., de Groot P.G., van den Elsen J.M., Ravelli R.B., Schouten A., Simmelink M.J., Derksen R.H., Kroon J., Gros P.

Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure

EMBO Journal (1999) 18:5166-5174

28. Schousboe I.

beta 2-Glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway

Blood (1985) 66:1086-1091

29. Koike T., Ichikawa K., Kasahara H., Atsumi T., Tsutsumi A., Matsuura E.

Epitopes on beta2-GPI recognized by anticardiolipin antibodies

Lupus (1998) 7 Suppl 2:S14-S17

30. McNeeley P.A., Diott J.S., Furie R.A., Jack R.M., Ortel T.L., Triplett D.A., Victoria E.J., Linnik M.D.

Beta2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies preferentially bind the amino terminal domain of beta2-glycoprotein I

Thrombosis and Haemostasis (2001) 86:590-595

31. Tsutsumi A., Matsuura E., Ichikawa K., Fujisaku A., Mukai M., Kobayashi S., Koike T.

Antibodies to beta 2-glycoprotein I and clinical manifestations in patients with systemic lupus erythematosus

Arthritis and Rheumatism (1996) 39:1466-1474

32. Roubey R.A.

Antigenic specificities of antiphospholipid autoantibodies: implications for clinical laboratory testing and diagnosis of the antiphospholipid syndrome

Lupus (1996) 5:425-430

33. Cabiedes J., Cabral A.R., Alarcon-Segovia D.

Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus associate more strongly with anti- beta 2-glycoprotein-I than with antiphospholipid antibodies

Journal of Rheumatology (1995) 22:1899-1906

34. Lao M., Setty S., Foss C.

Antiphospholipid antibody syndrome. A literature review

Minnesota Medicine (2001) 84:42-46

35. Asherson R.A., Khamashta M.A., Ordi-Ros J., Derksen R.H., Machin S.J., Barquinero J., Outt H.H., Harris E.N., Vilardell-Torres M., Hughes G.R.

The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features

Medicine (Baltimore) (1989) 68:366-374

36. Goldberg S.N., Conti-Kelly A.M., Greco T.P.

A family study of anticardiolipin antibodies and associated clinical conditions

Am.J Med (1995) 99:473-479

37. McNeil H.P., Gavaghan T.P., Krilis S.A., Geczy A.F., Chesterman C.N.

HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies

Clin Exp.Rheumatol. (1990) 8:425-426

38. Jedryka-Goral A., Jagiello P., D'Cruz D.P., Maldykowa H., Khamashta M.A., Hughes G.R., Swana G.T., Luft S.

Isotype profile and clinical relevance of anticardiolipin antibodies in Sjogren's syndrome

Annals of the Rheumatic Diseases (1992) 51:889-891

39. Hull R.G., Harris E.N., Gharavi A.E., Tincani A., Asherson R.A., Valesini G., Denman A.M., Froude G., Hughes G.R.

Anticardiolipin antibodies: occurrence in Behcet's syndrome

Annals of the Rheumatic Diseases (1984) 43:746-748

40. Malia R.G., Greaves M., Rowlands L.M., Lawrence A.C., Hume A., Rowell N.R., Moulton J., Holt C.M., Lindsey N., Hughes P.

Anticardiolipin antibodies in systemic sclerosis: immunological and clinical associations

Clinical and Experimental Immunology (1988) 73:456-460

41. Schleider M.A., Nachman R.L., Jaffe E.A., Coleman M.

A clinical study of the lupus anticoagulant

Blood (1976) 48:499-509

42. Stasi R., Stipa E., Masi M., Oliva F., Sciarra A., Perrotti A., Olivieri M., Zaccari G., Gandolfo G.M., Galli M., .

Prevalence and clinical significance of elevated antiphospholipid antibodies in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura

Blood (1994) 84:4203-4208

43. Hughes G.R.

The antiphospholipid syndrome and 'multiple sclerosis'

Lupus (1999) 8:89

44. Asherson R.A. und Cervera R.

Antiphospholipid antibodies and infections
Annals of the Rheumatic Diseases (2003) 62:388-393

45. Asherson R.A.

Antiphospholipid antibodies, malignancies and paraproteinemias
Journal of Autoimmunity (2000) 15:117-122

46. Bick R.L.

The antiphospholipid-thrombosis syndromes. Fact, fiction, confusion, and controversy
American Journal of Clinical Pathology (1993) 100:477-480

47. Cervera R., Khamashta M.A., Font J., Sebastiani G.D., Gil A., Lavilla P., Domenech I., Aydintug A.O., Jedryka-Goral A., de Ramon E., .

Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus
Medicine (Baltimore) (1993) 72:113-124

48. Waddell C.C. und Brown J.A.

The lupus anticoagulant in 14 male patients
JAMA (1982) 248:2493-2495

49. Fields R.A., Toubbeh H., Searles R.P., Bankhurst A.D.

The prevalence of anticardiolipin antibodies in a healthy elderly population and its association with antinuclear antibodies
Journal of Rheumatology (1989) 16:623-625

50. Manoussakis M.N., Tzioufas A.G., Silis M.P., Pange P.J., Goudevenos J., Moutsopoulos H.M.

High prevalence of anti-cardiolipin and other autoantibodies in a healthy elderly population
Clinical and Experimental Immunology (1987) 69:557-565

51. McNeil H.P., Chesterman C.N., Krilis S.A.

Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies

Advances in Immunology (1991) 49:193-280

52. Vianna J.L., Khamashta M.A., Ordi-Ros J., Font J., Cervera R., Lopez-Soto A., Tolosa C., Franz J., Selva A., Ingelmo M., .

Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a European Multicenter Study of 114 patients

American Journal of Medicine (1994) 96:3-9

53. Ginsberg J.S., Wells P.S., Brill-Edwards P., Donovan D., Moffatt K., Johnston M., Stevens P., Hirsh J.

Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism

Blood (1995) 86:3685-3691

54. Mandreoli M. und Zucchelli P.

Renal vascular disease in patients with primary antiphospholipid antibodies

Nephrology, Dialysis, Transplantation (1993) 8:1277-1280

55. Quereda C., Otero G.G., Pardo A., Orte L., Rivera M., Gonzalo A., Pascual J., Ortuno J.

Prevalence of antiphospholipid antibodies in nephropathies not due to systemic lupus erythematosus

American Journal of Kidney Diseases (1994) 23:555-561

56. Brunet P., Aillaud M.F., San Marco M., Philip-Joet C., Dussol B., Bernard D., Juhan-Vague I., Berland Y.

Antiphospholipids in hemodialysis patients: relationship between lupus anticoagulant and thrombosis

Kidney International (1995) 48:794-800

57. Piette J.C., Cacoub P., Wechsler B.

Renal manifestations of the antiphospholipid syndrome

Seminars in Arthritis and Rheumatism (1994) 23:357-366

58. Montalban J., Codina A., Ordi J., Vilardell M., Khamashta M.A., Hughes G.R.

Antiphospholipid antibodies in cerebral ischemia

Stroke (1991) 22:750-753

59. Chapman J., Abu-Katash M., Inzelberg R., Yust I., Neufeld M.Y., Vardinon N., Treves T.A., Korczyn A.D.

Prevalence and clinical features of dementia associated with the antiphospholipid syndrome and circulating anticoagulants

Journal of the Neurological Sciences (2002) 203-204:81-84

60. Levine S.R., Brey R.L., Joseph C.L., Havstad S.

Risk of recurrent thromboembolic events in patients with focal cerebral ischemia and antiphospholipid antibodies. The Antiphospholipid Antibodies in Stroke Study Group

Stroke (1992) 23:129-132

61. Hughes G.R.

Migraine, memory loss, and "multiple sclerosis". Neurological features of the antiphospholipid (Hughes') syndrome

Postgraduate Medical Journal (2003) 79:81-83

62. Asherson R.A. und Cervera R.

Unusual manifestations of the antiphospholipid syndrome

Clinical Reviews in Allergy and Immunology (2003) 25:61-78

63. Sanna G., Bertolaccini M.L., Cuadrado M.J., Laing H., Khamashta M.A., Mathieu A., Hughes G.R.

Neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus: prevalence and association with antiphospholipid antibodies

Journal of Rheumatology (2003) 30:985-992

64. Chapman J., Rand J.H., Brey R.L., Levine S.R., Blatt I., Khamashta M.A., Shoenfeld Y.

Non-stroke neurological syndromes associated with antiphospholipid antibodies: evaluation of clinical and experimental studies

Lupus (2003) 12:514-517

65. Alarcon-Segovia D., Deleze M., Oria C.V., Sanchez-Guerrero J., Gomez-Pacheco L., Cabiedes J., Fernandez L., Ponce d.L.

Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients

Medicine (Baltimore) (1989) 68:353-365

66. O'Hickey S., Skinner C., Beattie J.

Life-threatening right ventricular thrombosis in association with phospholipid antibodies

British Heart Journal (1993) 70:279-281

67. Asherson R.A. und Oakley C.M.

Pulmonary hypertension and systemic lupus erythematosus

Journal of Rheumatology (1986) 13:1-5

68. Ghosh S., Walters H.D., Joist J.H., Osborn T.G., Moore T.L.

Adult respiratory distress syndrome associated with antiphospholipid antibody syndrome

Journal of Rheumatology (1993) 20:1406-1408

69. Asherson R.A. und Cervera R.

Cardiac manifestations of the antiphospholipid syndrome

Coron.Artery Dis (1993) 4:1137-1143

70. Asherson R.A., Khamashta M.A., Baguley E., Oakley C.M., Rowell N.R., Hughes G.R.

Myocardial infarction and antiphospholipid antibodies in SLE and related disorders

Quarterly Journal of Medicine (1989) 73:1103-1115

71. Sturfelt G., Eskilsson J., Nived O., Truedsson L., Valind S.

Cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. A study of 75 patients from a defined population

Medicine (Baltimore) (1992) 71:216-223

72. Morton K.E., Gavaghan T.P., Krilis S.A., Daggard G.E., Baron D.W., Hickie J.B., Chesterman C.N.

Coronary artery bypass graft failure--an autoimmune phenomenon?

Lancet (1986) 2:1353-1357

73. Gabrielli F., Alcini E., Di Prima M.A., Mazzacurati G., Masala C.

Cardiac valve involvement in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome: lack of correlation with antiphospholipid antibodies

International Journal of Cardiology (1995) 51:117-126

74. Sanchez-Guerrero J., Reyes E., Alarcon-Segovia D.

Primary antiphospholipid syndrome as a cause of intestinal infarction

Journal of Rheumatology (1992) 19:623-625

75. Mackworth-Young C.G., Loizou S., Walport M.J.

Primary antiphospholipid syndrome: features of patients with raised anticardiolipin antibodies and no other disorder

Annals of the Rheumatic Diseases (1989) 48:362-367

76. Pelletier S., Landi B., Piette J.C., Ekert P., Coutellier A., Desmoulins C., Fadlallah J.P., Herson S., Valla D.

Antiphospholipid syndrome as the second cause of non-tumorous Budd-Chiari syndrome

Journal of Hepatology (1994) 21:76-80

77. Chedid A., Chadalawada K.R., Morgan T.R., Moritz T.E., Mendenhall C.L., Hammond J.B., Emblad P.W., Cifuentes D.C., Kwak J.W., Gilman-Sachs A., .

Phospholipid antibodies in alcoholic liver disease

Hepatology (1994) 20:1465-1471

78. Cervera R., Piette J.C., Font J., Khamashta M.A., Shoenfeld Y., Camps M.T., Jacobsen S., Lakos G., Tincani A., Kontopoulou-Griva I., Galeazzi M., Meroni P.L., Derksen R.H., de Groot P.G., Gromnica-Ihle E., Baleva M., Mosca M., Bombardieri S., Houssiau F., Gris J.C., Quere I., Hachulla E., Vasconcelos C., Roch B., Fernandez-Nebro A., Boffa M.C., Hughes G.R., Ingelmo M.

Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients

Arthritis and Rheumatism (2002) 46:1019-1027

79. Asherson R.A., Cervera R., Piette J.C., Font J., Lie J.T., Burcoglu A., Lim K., Munoz-Rodriguez F.J., Levy R.A., Boue F., Rossert J., Ingelmo M.

Catastrophic antiphospholipid syndrome. Clinical and laboratory features of 50 patients

Medicine (Baltimore) (1998) 77:195-207

80. Cerveny K.C. und Sawitzke A.D.

Relapsing catastrophic antiphospholipid antibody syndrome: a mimic for thrombotic thrombocytopenic purpura?

Lupus (1999) 8:477-481

81. Lockwood C.J., Romero R., Feinberg R.F., Clyne L.P., Coster B., Hobbins J.C.

The prevalence and biologic significance of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in a general obstetric population

American Journal of Obstetrics and Gynecology (1989) 161:369-373

82. Buchanan N.M., Khamashta M.A., Morton K.E., Kerlake S., Baguley E.A., Hughes G.R.

A study of 100 high risk lupus pregnancies

American Journal of Reproductive Immunology (1992) 28:192-194

83. Harris E.N., Asherson R.A., Gharavi A.E., Morgan S.H., Derue G., Hughes G.R.

Thrombocytopenia in SLE and related autoimmune disorders: association with anticardiolipin antibody

British Journal of Haematology (1985) 59:227-230

84. Matsuda J., Gotoh M., Gohchi K., Kawasugi K., Tsukamoto M., Saitoh N.

Anti-endothelial cell antibodies to the endothelial hybridoma cell line (EAhy926) in systemic lupus erythematosus patients with antiphospholipid antibodies

British Journal of Haematology (1997) 97:227-232

85. Meroni P.L., Del Papa N., Raschi E., Panzeri P., Borghi M.O., Tincani A., Balestrieri G., Khamashta M.A., Hughes G.R., Koike T., Krilis S.A.

Beta2-glycoprotein I as a 'cofactor' for anti-phospholipid reactivity with endothelial cells

Lupus (1998) 7 Suppl 2:S44-S47

86. Ames P.R.

Antiphospholipid antibodies, thrombosis and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: a unifying 'membrane stress syndrome' hypothesis

Lupus (1994) 3:371-377

87. Vaarala O., Alfthan G., Jauhiainen M., Leirisalo-Repo M., Aho K., Palosuo T.

Crossreaction between antibodies to oxidised low-density lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus

Lancet (1993) 341:923-925

88. Horkko S., Miller E., Dudl E., Reaven P., Curtiss L.K., Zvaifler N.J., Terkeltaub R., Pierangeli S.S., Branch D.W., Palinski W., Witztum J.L.

Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids. Recognition of cardiolipin by monoclonal antibodies to epitopes of oxidized low density lipoprotein

J.Clin.Invest (1996) 98:815-825

89. Kandiah D.A. und Krillis S.A.

Beta 2-glycoprotein I

Lupus (1994) 3:207-212

90. Oosting J.D., Derksen R.H., Bobbink I.W., Hackeng T.M., Bouma B.N., de Groot P.G.

Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism?

Blood (1993) 81:2618-2625

91. Gruel Y.

Antiphospholipid syndrome and heparin-induced thrombocytopenia: update on similarities and differences

Journal of Autoimmunity (2000) 15:265-268

92. Crowther M.A., Ginsberg J.S., Julian J., Denburg J., Hirsh J., Douketis J., Laskin C., Fortin P., Anderson D., Kearon C., Clarke A., Geerts W., Forgie M., Green D., Costantini L., Yacura W., Wilson S., Gent M., Kovacs M.J.

A comparison of two intensities of warfarin for the prevention of recurrent thrombosis in patients with the antiphospholipid antibody syndrome

New England Journal of Medicine (2003) 349:1133-1138

93. Kemkes-Matthes B.

Blutgerinnung und Thrombose, 3.Auflage

Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2001)

94. Schjetlein R., Sletnes K.E., Wisloff F.

A quantitative, semi-automated and computer-assisted test for lupus anticoagulant

Thrombosis Research (1993) 69:239-250

95. Thiagarajan P., Pengo V., Shapiro S.S.

The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants

Blood (1986) 68:869-874

96. Dahlback B., Carlsson M., Svensson P.J.

Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (1993) 90:1004-1008

97. Greengard J.S., Sun X., Xu X., Fernandez J.A., Griffin J.H., Evatt B.

Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va

Lancet (1994) 343:1361-1362

98. Bertina R.M., Koeleman B.P., Koster T., Rosendaal F.R., Dirven R.J., de Ronde H., van der Velden P.A., Reitsma P.H.

Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C

Nature (1994) 369:64-67

99. Zoller B., Svensson P.J., He X., Dahlback B.

Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C

J.Clin.Invest (1994) 94:2521-2524

100. Hampton K.K., Preston F.E., Greaves M.

Resistance to activated protein C

New England Journal of Medicine (1994) 331:130

101. Ehrenforth S., Radtke K.P., Scharrer I.

Acquired activated protein C-resistance in patients with lupus anticoagulants

Thrombosis and Haemostasis (1995) 74:797-798

102. Jennings I., Kitchen S., Woods T.A., Preston F.E., Greaves M.

Potentially clinically important inaccuracies in testing for the lupus anticoagulant: an analysis of results from three surveys of the UK National External Quality Assessment Scheme (NEQAS) for Blood Coagulation

Thrombosis and Haemostasis (1997) 77:934-937

103. **Arnout J., Meijer P., Vermeylen J.**

Lupus anticoagulant testing in Europe: an analysis of results from the first European Concerted Action on Thrombophilia (ECAT) survey using plasmas spiked with monoclonal antibodies against human beta2-glycoprotein I

Thrombosis and Haemostasis (1999) 81:929-934

104. **Lawrie A.S., Mackie I.J., Purdy G., Machin S.J.**

The sensitivity and specificity of commercial reagents for the detection of lupus anticoagulant show marked differences in performance between photo-optical and mechanical coagulometers

Thrombosis and Haemostasis (1999) 81:758-762

105. **Taher A., Abiad R., Uthman I.**

Coexistence of lupus anticoagulant and acquired haemophilia in a patient with monoclonal gammopathy of unknown significance

Lupus (2003) 12:854-856

106. **Greaves M.**

Antiphospholipid antibodies and thrombosis

Lancet (1999) 353:1348-1353

107. **Esmon N.L., Safa O., Smirnov M.D., Esmon C.T.**

Antiphospholipid antibodies and the protein C pathway

Journal of Autoimmunity (2000) 15:221-225

108. **Shi W., Krilis S.A., Chong B.H., Gordon S., Chesterman C.N.**

Prevalence of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in a healthy population

Australian and New Zealand Journal of Medicine (1990) 20:231-236

109. **Denis-Magdelaine A., Flahault A., Verdy E.**

Sensitivity of sixteen APTT reagents for the presence of lupus anticoagulants

Haemostasis (1995) 25:98-105

110. Proven A., Bartlett R.P., Moder K.G., Chang-Miller A., Cardel L.K., Heit J.A., Homburger H.A., Petterson T.M., Christianson T.J., Nichols W.L.

Clinical importance of positive test results for lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies

Mayo Clinic Proceedings (2004) 79:467-475

6 Anhang

6.1 Zusammenfassung in englischer Sprache

Lupus anticoagulant is associated with an increased risk of thrombosis and laboratory detection is of major importance. Multiple tests are available for screening and confirmation, but they differ in sensitivity and specificity, frequently lacking the ability to discriminate between the presence of lupus anticoagulant, heparin and oral anticoagulants.

The main purpose of this work was to develop an automated, sensitive APTT-based assay, using mixtures of a lupussensitive and a lupusinsensitive APTT-reagent with normal plasma for detection of lupus anticoagulant. In all patients two APTTs were performed, one with each reagent, on mixtures of test plasma and normal plasma. The ratio between the two clotting times was divided by the corresponding ratio for the normal plasma.

99 healthy volunteers, 10 patients treated with unfractionated heparin intravenously, 19 patients on stable oral anticoagulation, 5 patients with haemophilia A and 15 patients with antiphospholipid-antibody-syndrome (APS) were investigated.

The within-series imprecision and the between-series imprecision were excellent with coefficients of variation between 1.5 and 1.9%. The mean + 2 SD of the LR of the 99 healthy volunteers was 1.07 and was used as upper reference limit. All patients treated either with heparin or oral anticoagulants remained negative in the MIXCON-LA-assay (specificity: 100%), while 1/5 patients with haemophilia A, who had solely developed a factor VIII-inhibitor, showed a false positive result. In 13/15 patients with APS an increased ratio was observed (sensitivity: 87%).

Thus this assay system allows precise, specific and sensitive detection of lupus anticoagulants.

6.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marek Christoph Humpich
Geburtsdatum: 12. April 1975
Geburtsort: Tomaszow Lubelski (PL)
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1993 -1987: Grundschule, Kleve
1987 -1988: Johanna Sebus Gymnasium, Kleve
1989 -1995: Geschwister Scholl Gymnasium, Unna
1995: Abitur

Studium

1996 - 2003 Medizin an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität,
Frankfurt/Main.
04/1999 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
04/2000 Erster Abschnitt (1.Staatsexamen)
09/2002 Zweiter Abschnitt (2.Staatsexamen)
11/2003 Dritter Abschnitt (3.Staatsexamen)

Tätigkeit als Assistenzarzt

01/2004 - Heute Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität,
Klinik für Neurologie, Frankfurt/Main

Frankfurt am Main, 15.11.2004

6.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„MixCon-LA: Entwicklung und Validierung eines neuen Testsystems zur Erfassung des Lupus-Antikoagulans im Hinblick auf eine optimierte Labordiagnostik des Antiphospholipid-Syndroms“

im Zentrum der Inneren Medizin des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, Medizinische Klinik III, Schwerpunkt Angiologie unter der Leitung von Frau PD Dr. med. E. Lindhoff-Last

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit ist im folgenden Publikationsorgan veröffentlicht worden: *Clinical and Applied Thrombosis and Hemostasis (2002) Apr;8(2):163-7*

Lindhoff-Last E, Humpich M, Schmitt J, Rodiger S, Seifried E, Bauersachs R.
MIXCON-LA: a precise, sensitive and specific aPTT-based assay for detection of lupus anticoagulant.

Frankfurt am Main, 15.11.2004