

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Medizinische Klinik I, Schwerpunkt Angiologie
(Direktor: Prof. Dr. med. K.-H. Usadel)

**Optimierte Labordiagnostik
zum Nachweis einer
Heparin-induzierten
Thrombozytopenie (HIT) Typ II**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Frank Gerdson
aus Oldenburg

Frankfurt am Main, 2002

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| 1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG | 1 |
| 2. LITERATURÜBERSICHT | 3 |
| 2.1 HEPARIN: HISTORIE, STRUKTUR, WIRKUNG, INDIKATIONEN..... | 3 |
| 2.2 NEBENWIRKUNGEN DER HEPARINTHERAPIE..... | 5 |
| 2.3 NICHT-IMMUNOLOGISCHE HEPARIN-INDUZIERTE THROMBOZYTOPENIE (HIT TYP I)..... | 5 |
| 2.4 IMMUNOLOGISCHE HEPARIN-INDUZIERTE THROMBOZYTOPENIE (HIT TYP II)..... | 6 |
| 2.4.1 <i>Inzidenz</i> | 6 |
| 2.4.2 <i>Pathogenese der HIT Typ II</i> | 7 |
| 2.4.2.1 HIT Typ II-Antikörper und FcγIIA Rezeptor..... | 7 |
| 2.4.2.2 PF4/Heparin-Antigen..... | 8 |
| 2.4.2.3 Genetische Aspekte der HIT Typ II..... | 10 |
| 2.4.2.4 Weitere diskutierte Pathomechanismen der HIT Typ II..... | 12 |
| 2.4.3 <i>Klinik der HIT Typ II</i> | 13 |
| 2.4.3.1 Die Thrombozytopenie..... | 13 |
| 2.4.3.2 HIT Typ II mit Thrombosen..... | 14 |
| 2.4.3.3 Weitere klinische Manifestationen..... | 15 |
| 2.4.4 <i>Diagnostik der HIT Typ II</i> | 16 |
| 2.4.4.1 Bedeutung der Diagnostik..... | 16 |
| 2.4.4.2 Funktionelle Assays..... | 17 |
| 2.4.4.3 Immunoassays..... | 19 |
| 2.4.5 <i>Therapie der HIT Typ II</i> | 20 |
| 3. PATIENTEN | 22 |
| 3.1 PATIENTENKOLLEKTIVE..... | 22 |
| 3.2 GRUPPENDEFINITIONEN..... | 22 |
| 3.2.1 <i>Gruppe I - HIT Typ II mit Thrombosen</i> | 22 |
| 3.2.2 <i>Gruppe II – HIT Typ II ohne Thrombosen</i> | 23 |
| 3.2.3 <i>Gruppe III</i> | 23 |
| 3.2.4 <i>Gruppe IV</i> | 23 |
| 3.3 KLINISCHE CHARAKTERISTIKA DER GRUPPEN..... | 24 |
| 3.3.1 <i>Gruppe I</i> | 24 |
| 3.3.2 <i>Gruppe II</i> | 26 |
| 3.3.3 <i>Gruppe III</i> | 27 |
| 3.3.4 <i>Gruppe IV</i> | 27 |
| 4. METHODEN | 30 |
| 4.1 GEWINNUNG DER PLASMEN (PRÄANALYTIK)..... | 30 |
| 4.1.1 <i>Blutentnahme</i> | 30 |
| 4.1.2 <i>Zentrifugation und Lagerung</i> | 30 |
| 4.1.3 <i>Reagenzien und Geräte</i> | 30 |
| 4.2 HEPARIN/PF4 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (HPF4-ELISA)..... | 30 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.2.1 | <i>Testprinzip</i> | 30 |
| 4.2.2 | <i>Reagenzien und Geräte</i> | 32 |
| 4.2.3 | <i>Testvorbereitung</i> | 33 |
| 4.2.4 | <i>Testdurchführung</i> | 33 |
| 4.3 | HEPARIN-INDUZIERTER PLÄTTCHEN-AKTIVIERUNGSTEST (HIPA-TEST)..... | 34 |
| 4.3.1 | <i>Testprinzip</i> | 34 |
| 4.3.2 | <i>Reagenzien und Geräte</i> | 35 |
| 4.3.3 | <i>Testvorbereitung</i> | 35 |
| 4.3.4 | <i>Testdurchführung</i> | 36 |
| 4.3.5 | <i>Testauswertung</i> | 37 |
| 4.4 | STATISTISCHE METHODEN | 37 |
| 5. | ERGEBNISSE | 39 |
| 5.1 | GRUNDERKRANKUNGEN UND KLINIK DER HIT TYP II PATIENTEN | 39 |
| 5.2 | HEPARIN/PF4-EIA TESTERGEBNISSE..... | 41 |
| 5.3 | ABSORPTIONSWERTE DER HEPARIN/PF4- IMMUNGLOBULIN- MISCHUNG AUS IGG, IGM UND IGA..... | 43 |
| 5.4 | ABSORPTIONSWERTE DER HEPARIN/PF4- IMMUNGLOBULIN- KLASSE IGG | 45 |
| 5.5 | ABSORPTIONSWERTE DER HEPARIN/PF4-IMMUNGLOBULIN- KLASSE IGM..... | 47 |
| 5.6 | ABSORPTIONSWERTE DER HEPARIN/PF4-IMMUNGLOBULIN- KLASSE IGA | 48 |
| 5.7 | HEPARIN-INDUZIERTER PLÄTTCHENAKTIVIERUNGSTEST (HIPA) | 50 |
| 5.8 | DISKRIMINANZANALYSE, SPEZIFITÄT, SENSITIVITÄT..... | 52 |
| 6. | DISKUSSION..... | 58 |
| 6.1 | EINLEITENDE BEMERKUNGEN..... | 58 |
| 6.2 | STUDIENZIELE..... | 59 |
| 6.3 | DISKUSSION DER KLINISCHEN KRITERIEN FÜR DIE GRUPPENDEFINITIONEN | 60 |
| 6.4 | BEWERTUNG DES HEPARIN-INDUZIERTEN PLÄTTCHEN-AKTIVIERUNGSTESTS (HIPA) | 62 |
| 6.5 | BEWERTUNG DES HEPARIN/PF4- ANTIKÖRPER-ELISA | 64 |
| 6.6 | DISKUSSION DER SUBKLASSENANALYSE..... | 66 |
| 6.6.1 | <i>IgM</i> | 66 |
| 6.6.2 | <i>IgA</i> | 68 |
| 6.6.3 | <i>IgG</i> | 69 |
| 7. | ZUSAMMENFASSUNG..... | 75 |
| | LITERATURVERZEICHNIS..... | 78 |

ABKÜRZUNGEN

| | |
|-------|---|
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AT | Antithrombin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| DIC | disseminierte intravasale Gerinnung |
| EDTA | Äthylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| FXa | aktivierter Faktor X |
| Gp | Glykoprotein |
| HIPA | Heparin-induzierter Plättchenaktivierungstest |
| HAT | heparin associated thrombocytopenia |
| HIT | Heparin-induzierte Thrombozytopenie |
| HPF4 | Heparin/PF4-Immunoassay |
| IE | Internationale Einheiten |
| Ig | Immunglobulin |
| ITP | Autoimmunthrombozytopenie |
| IL | Interleukin |
| KHK | Koronare Herzkrankheit |
| Kd | Kilodalton |
| MFR | minimale Fehlklassifikationsrate |
| MW | Mittelwert |
| NAP | Neutrophile aktivierendes Peptid |
| NMH | niedermolekulares Heparin |
| OPD | ortho-Diphenylendiamin |
| PAT | Plättchenaktivierungstest |
| PF4 | Plättchenfaktor 4 |
| SD | Standardabweichung |
| SRA | Serotonin-Release-Assay |
| UFH | unfraktioniertes Heparin |

1. Einleitung und Fragestellung

Wegen seiner gerinnungshemmenden Eigenschaft ist Heparin ein unentbehrliches Medikament in der Prophylaxe und Therapie thromboembolischer Komplikationen geworden. Eine seiner bedeutendsten unerwünschten Nebenwirkungen ist die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT), die sich in einem Abfall der Thrombozytenzahl nach Therapiebeginn äußert.

Sowohl nach Pathomechanismus als auch Klinik lassen sich zwei verschiedene Formen der Heparin-induzierten Thrombozytopenie unterscheiden, die früher Typ I und Typ II genannt wurden.

Während die nicht-immunologische HIT nur mit einer milden Thrombozytopenie von meist weniger als 30% des Ausgangswerts unmittelbar in den ersten Tagen nach Therapiebeginn einhergeht und ansonsten keine bedeutenden Komplikationen aufweist, ist die seltenere immunologische HIT geprägt von einem Thrombozytenabfall, sowie insbesondere von lebensbedrohlichen thromboembolischen Komplikationen, und ist damit von weitaus größerer klinischer Bedeutung.

Die thromboembolischen Komplikationen können sowohl venöser als auch arterieller Art sein und sind zeitlich mit dem Auftreten der Thrombozytopenie assoziiert.

Entsprechend des mittlerweile weitgehend aufgeklärten immunologischen Pathomechanismus tritt die Thrombozytopenie bei HIT Typ II in der Regel mit einer zeitlichen Verzögerung von ungefähr 5 bis 20 Tagen nach Therapiebeginn auf, ist unabhängig von der applizierten Heparinmenge und erst nach Absetzen des Medikamentes reversibel.

Hieraus wird ersichtlich, daß die wichtigste therapeutische Maßnahme bei HIT Typ II in der sofortigen Beendigung der Heparintherapie besteht.

Da jedoch gerade jene Patienten, die unter dem Verdacht einer HIT Typ II stehen, häufig an einer antikoagulationsbedürftigen thromboembolischen Grunderkrankung leiden, beziehungsweise differentialdiagnostisch auch andere Ursachen einer Thrombozytopenie in Erwägung gezogen werden müssen, wie z.B. die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC), kommt der zuverlässigen Sicherung der Verdachtsdiagnose HIT durch laboratorische Testmethoden eine Schlüsselrolle zu.

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Testsystemen entwickelt, die jedoch entweder wenig praktikabel sind oder eine nur geringe Sensitivität bzw. Spezifität bieten.

Funktionelle Testsysteme, die auf dem indirekten Nachweis von Antikörpern durch Aktivierung von Spenderthrombozyten basieren, verfügen zwar über eine gute Aussagekraft, sind aber aus verschiedenen Gründen wenig praktikabel.

Hingegen sind direkte Antikörpernachweisverfahren als ELISA-Methoden gut durchführbar, aber wenig spezifisch, da bekannt ist, daß nur ein eher geringer Teil der Patienten, die Antikörper bilden, das klinische Bild der HIT Typ II entwickeln.

Ziel dieser Arbeit ist es gewesen, herauszufinden, ob sich die Spezifität der ELISA-Methode durch die isolierte Betrachtung bestimmter Immunglobulinklassen verbessern läßt.

Hierzu wurden Patientenkollektive mit unterschiedlicher Symptomatik analysiert und Vergleiche mit einem etablierten funktionellen Testsystem angestellt.

2. Literaturübersicht

2.1 Heparin: Historie, Struktur, Wirkung, Indikationen

1916 entdeckte McLean die antikoagulierende Wirkung eines aus Hundeleber gewonnenen Extraktes, welches Howell und Holt (1918) Heparin (Hepar = Leber) nannten. Erst 20 Jahre später kam es durch Crafoord (1937) und Murray (1937) zu ersten klinischen Anwendungen, die in der Anfangsphase geprägt waren von schwerwiegenden Nebenwirkungen, insbesondere Blutungskomplikationen, zurückzuführen auf Dosisfindungsschwierigkeiten und den unzureichenden Reinheitsgrad des aus Rinderlunge und Schweinemukosa gewonnenen Heparins.

Heparin besteht aus strukturell unterschiedlichen Mukopolysaccharidketten, die sich aus glykosidisch gebundenen di- und trisulfatierten Disaccharideinheiten zusammensetzen, also hochmolekulare Polyanionen sind. Durch seine negative Ladung ist es in der Lage, mit einer Reihe von Blutbestandteilen wie Blutzellen und diversen Proteinen zu interagieren. Als körpereigene Substanz wird es in Mastzellen gebildet und ist in vielen Geweben nachweisbar (Nielsen et al. 1988, Schwartz et al.1990).

Die handelsüblichen Präparate variieren in der Kettenlänge der Heparinmoleküle zwischen 12 und 100 Monosacchariden, entsprechend einem Molekulargewicht von 4.000 bis 40.000 Dalton, wobei das mittlere Gewicht unfraktionierten Heparins (UFH) bei etwa 15.000 Dalton liegt (Nielsen et al.1988, Quick et al. 1988).

Durch Polymerisation aus unfraktioniertem Heparin gewonnene niedermolekulare Heparine (NMH), besitzen denselben Sulfatierungsgrad aber ein niedrigeres Molekulargewicht (4000 - 6000 Dalton) (Nielson et al. 1988). Sie zeichnen sich durch eine bessere Bioverfügbarkeit, längere Wirkdauer und eine geringere Nebenwirkungsrate aus (Briant et al. 1989, Breddin et al. 1989, Harenberg et al. 1990).

Anfang der 70er Jahre konnte der Wirkungsmechanismus von Heparin aufgeklärt werden. Rosenberg et al. (1973) bewiesen, daß Heparin seine gerinnungshemmende Wirkung indirekt über das körpereigene Antithrombin entfaltet: Durch Komplexierung mit Antithrombin

(AT), einem α -Globulin aus der Albuminfraktion, kommt es zu einer katalytischen Verstärkung der Inhibitorwirkung von AT auf diverse Serinproteasen (u.a. Faktor IXa, Xa, XIa, XIIa) des Gerinnungssystems. Am bedeutendsten sind der hemmende Einfluß auf die aktivierten Faktoren II (Thrombin) und X. Die Inhibitionskinetik von AT wird durch Heparin um ein tausendfaches beschleunigt (Rosenberg et al. 1973, Lindahl et al. 1978, Schwartz et al. 1990). Als Voraussetzung für die Bindung an AT muß ein Heparinfragment eine genau definierte Pentasaccharidsequenz enthalten (Choay et al. 1983, Schwartz et al. 1990, Fareed et al. 1985), über die aber nicht alle Heparine verfügen, weswegen sie sich in Fraktionen mit hoher bzw. niedriger AT-Affinität einteilen lassen (Andersson et al. 1976). Low-Affinity Heparine wirken über das AT-ähnliche Gerinnungsprotein Heparin Cofaktor II (HC II), das nur Faktor IIa hemmt (Fareed et al. 1985, Choay et al. 1989).

Für eine Thrombinaktivierung durch Heparin-AT-Komplex wird eine Mindestkettenlänge von 16 - 20 Saccharidbausteinen entsprechend einem Molekulargewicht von etwa 5000 Dalton benötigt. Sind die Heparinketten kürzer, besitzen aber die zur AT-Bindung erforderliche Pentasaccharidsequenz, wie es bei den niedermolekularen Heparinen (NMH) der Fall ist, erfolgt eine selektive Faktor Xa-Hemmung durch Heparin-AT-Komplex (Choay et al. 1989), während langkettiges UFH vorzugsweise die Faktor II-Aktivität hemmt (Haas 1996).

Ende der 70er Jahre eröffnete die Entwicklung niedermolekularer Heparine neue Aspekte in der Therapie thromboembolischer Komplikationen (Barrowcliffe et al 1979), deren Nutzen zur postoperativen Thromboseprophylaxe erstmalig von Kakkar et al. 1982 erprobt wurde. Von großer klinischer Bedeutung war das Jahr 1986, als unfraktioniertes Heparin in niedriger Dosis (low-dose) auf der NIH-Konsensus-Konferenz weltweit zur Prophylaxe tiefer Beinvenenthrombosen anerkannt wurde. In der Europäischen Konsensus-Erklärung von 1991 wurde dann auch den niedermolekularen Heparinen ein besonderer klinischer Stellenwert, der in der Prophylaxe im sogenannten Hochrisikobereich liegt, zugewiesen.

Mittlerweile ist die peri- und postoperative Prophylaxe thromboembolischer Komplikationen in der Allgemein- und Unfallchirurgie und die Therapie der tiefen Beinvenenthrombose, sowie der Lungenembolie als Indikation für NMH allgemein anerkannt (Harenberg et al. 1999).

2.2 Nebenwirkungen der Heparintherapie

An Nebenwirkungen der Heparintherapie ist neben Blutungskomplikationen, allergischen Reaktionen, reversiblen Haarausfall und Osteoporose besonders die Heparin-induzierte Thrombozytopenie von klinischer Relevanz.

Ein thrombozytopenischer Effekt nach Heparininjektion bei gesunden Menschen wurde erstmalig von Gollub et al. (1962) beobachtet. 1973 beschrieben Rhodes et al. erstmals die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) als eine auf einem immunologischen Mechanismus basierende Krankheit.

Nach dem bisherigen Wissensstand wird zwischen den beiden Entitäten nicht-immunologische Heparin-induzierte Thrombozytopenie (Typ I) und immunologische Heparin-induzierten Thrombozytopenie (Typ II) differenziert. Beide Formen unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihres Pathomechanismus, ihrer Inzidenz, klinischem Verlauf und Relevanz voneinander (Warkentin et. al. 1998 a, Greinacher et al.1995 a).

2.3 Nicht-immunologische Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT Typ I)

In mehr als 10% der Fälle kann Heparin zu einem milden Thrombozytenabfall (<30%) innerhalb der ersten Tage nach Therapiebeginn führen, wobei selten Werte von 100.000/ μ l unterschritten werden und sich die Thrombozytenzahlen in der Regel trotz Fortsetzung der Therapie erholen (Carreras et al. 1980, Chong et al. 1989 a). Wegen des Fehlens gravierender Komplikationen wird dem Typ I im Gegensatz zum Typ II keine große klinische Bedeutung beigemessen. Er bedarf keiner speziellen Therapie (Warkentin et Kelton 1991).

Pathogenetisch wird eine direkte Bindung von Heparin an Thrombozyten angenommen, die zu einer Minderung des thrombozytären cAMP-Spiegel führt. Dies hat ein Absinken der Aktivierungsschwelle zur Folge, so daß die Thrombozyten leichter auf proaggregatorische Reize, wie Kollagen oder ADP, reagieren (Chong et al. 1990, Chong et al. 1989 b). Ein heparinspezifischer Oberflächenrezeptor wurde bislang nicht identifiziert. Das Ausmaß der Thrombozytopenie hängt einerseits vom Molekulargewicht und Sulfatierungsgrad, andererseits von der Voraktivierung der Thrombozyten ab (Horne et al. 1989 und 1990).

Ein Labortest zum Nachweis der HIT Typ I ist nicht bekannt und aufgrund der mangelnden klinischen Relevanz entbehrlich (Greinacher 1995 a).

2.4 Immunologische Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT Typ II)

2.4.1 Inzidenz

Obwohl die ersten prospektiven Studien schon über 20 Jahre zurückliegen (Bell et al. 1976, Nelson et al. 1978), besteht nach wie vor eine gewisse Unsicherheit bezüglich der Inzidenz der HIT Typ II (Warkentin et al. 1998 b).

Zurückzuführen ist dies zum einen auf die Tatsache, daß diesbezügliche Studien auf Kollektive mit unterschiedlichen Grunderkrankungen zurückgriffen und deshalb nicht vergleichbar sind, da die Inzidenzen in erster Linie in Abhängigkeit von der Grunderkrankung schwanken. Zum anderen wurden in Unkenntnis der unterschiedlichen Entitäten von HIT Typ I und II klinische Charakteristika wie der typische Thrombozytenverlauf der HIT Typ II nicht sorgfältig berücksichtigt, zumal Thrombozytopenien in einer Krankenhauspopulation recht häufig unabhängig von einer Heparintherapie auftreten. So fanden Bell et al. (1976) und Nelson et al. (1978) Inzidenzen um 30%, die von anderen Studien nicht bestätigt wurden und nach heutigen Einschätzungen als überhöht gelten (Gallus et al. 1980, Malcolm et al. 1979, Powers et al. 1984).

Eine von Warkentin (1994 a) angestellte Metaanalyse aus 14 prospektiven Studien, die insgesamt 1336 Patienten einschloß, errechnete eine Inzidenz von 3,4 % für HIT Typ II ohne Thrombosen und 1% für HIT Typ II mit Thrombosen.

Diese Ergebnisse korrelieren gut mit der bislang größten prospektiven Studie, in der insgesamt 665 hüftoperierte Patienten auf die Inzidenz von HIT Typ II unter NMH und UFH untersucht wurden (Warkentin et al. 1995). Von 332 mit UFH behandelten Patienten entwickelten 2,7 % eine labordiagnostisch gesicherte HIT Typ II. Unter den 333 Patienten mit NMH trat kein einziger Fall einer HIT Typ II auf.

Daß die Inzidenzen bei konservativ behandelten Patienten deutlich niedriger liegen, zeigen Studien von Kappers-Klune et al. (1997), die bei 358 kardiologischen und neurologischen

intravenös mit UFH behandelten Patienten eine Inzidenz einer serologisch gesicherten HIT von 0,3 % fanden, und von Greinacher et al. (1996 b), die unter 165 chronisch niereninsuffizienten, während der Hämodialyse mit UFH antikoagulierten Patienten keinen Patienten mit HIT II-typischer Klinik identifizieren konnten.

Alles in allem läßt sich das Risiko in etwa auf 0,1 - 3 % schätzen, wobei diese Schwankungen in eindeutiger Abhängigkeit zur Heparinart, Therapiedauer und der Grunderkrankung zu stehen scheinen.

2.4.2 Pathogenese der HIT Typ II

2.4.2.1 HIT Typ II-Antikörper und FcγIIA Rezeptor

Im Gegensatz zur HIT Typ I liegt der Entstehung der HIT Typ II ein immunologischer Mechanismus zu Grunde (Warkentin et al. 1989, Chong et al. 1989 b).

Rhodes et al. (1973) erkannten erstmals, daß Serum von Patienten mit HIT Typ II in der Lage ist, in vitro Blutplättchen von Spendern in Anwesenheit von Heparin zu aktivieren.

Die Plättchenaktivierung und anschließende Aggregation wird als Ursache für die HIT-typischen Symptome Thrombozytopenie und thrombembolische Komplikationen angesehen.

In vivo ist eine generalisierte Plättchenaktivierung durch erhöhte Plasmaspiegel von β -Thromboglobulin, P-Selektin (Speicherproteine aus thrombozytären Vesikeln) (Chong et al. 1994) und Thromboxan A₂ aus einem gesteigerten Arachidonsäurestoffwechsel nachweisbar (Chong et al. 1982). Thromboxan A₂ wirkt vasokonstriktorisch und proaggregatorisch, d.h. es verstärkt eine durch Kollagen, Thrombin oder andere Agonisten induzierte Plättchenaggregation.

Der plättchenaktivierende Effekt wurde auf einen Serumfaktor zurückgeführt (Green et al. 1978, Cimo et al. 1979, Pfueller et al. 1986), der chromatographisch aus HIT- Patientenserum isoliert und als Bestandteil der Immunglobulinfraktion identifiziert werden konnte (Pfueller et al. 1986, Chong et al. 1989 b, Kelton et al. 1988). Zum überwiegenden Teil konnten Immunglobuline der Klasse IgG isoliert werden (Green et al. 1978, Chong et al. 1982, Lynch et al. 1985), seltener auch Immunglobuline der Klassen IgM und IgA (Cimo et al. 1979). Ähnlich wie die starken Plättchenagonisten Thrombin oder Kollagen induzieren HIT-

Antikörper in vitro die Bildung von thrombozytären Mikropartikeln (Warkentin et al. 1996 b). Diese mizellenartigen, phospholipidreichen Membranabsprengungen verfügen über eine starke prokoagulatorische Potenz, indem sie die sekundäre Hämostase aktivieren, weswegen sie hauptsächlich für die Entstehung von Thrombosen in vivo verantwortlich gemacht werden (Warkentin et al 1996 b).

Der plättchenaktivierende Effekt der Immunglobuline wird vermittelt durch den thrombozytären Fc γ IIA-Rezeptor: Fc γ -Rezeptoren kommen insbesondere auf Thrombozyten und Phagozytosezellen vor und vermitteln durch Immunglobulinbindung eine Zellaktivierung, wobei sie ausschließlich Affinität zu den Fc-Fragmenten der Immunglobulinklasse IgG besitzen (Anderson et al. 1995). Der Subtyp Fc γ IIA ist nur auf Blutplättchen zu finden. Seine Dichte auf der Thrombozytenoberfläche schwankt in der Normalpopulation zwischen 700 und 4000 je Thrombozyt (Anderson et al. 1995). Während des akuten Geschehens einer HIT Typ II ist die Dichte der Fc γ IIA-Rezeptoren als Zeichen der Thrombozytenaktivierung massiv erhöht (Chong et al. 1993 b). Die Plättchenaktivierung, die die HIT-Immunglobuline durch Bindung an den Fc γ IIA-Rezeptor auslösen können, läßt sich in vitro durch F(ab')₂ Fragmente monoklonaler Antikörper gegen Fc γ IIA-Rezeptor hemmen, was auch von diagnostischer Bedeutung ist (Chong et al. 1989 b, Kelton et al. 1988). Spenderplättchen von Patienten mit Bernhard-Soulier-Syndrom, einem genetischem Defekt mit Mangel thrombozytärer Glykoproteine Ib, V und IX, werden ebenfalls durch HIT-Antikörper aktiviert. Diese Plättchenrezeptoren sind demnach nicht involviert (Chong et al. 1989 b, Kelton et al. 1988).

2.4.2.2 PF4/Heparin-Antigen

Entgegen ursprünglicher Vermutungen (Wahl et al. 1978) ist Heparin nicht alleine das Antigen der Immunreaktion der HIT Typ II, sondern neben Heparin ist ein Plättchenprotein an der Antigenbildung beteiligt (Lynch et al. 1985, Gruel et al. 1993).

Amiral et al. (1992) identifizierten einen Komplex aus Heparin und Plättchenfaktor 4 (PF4) als Zielantigen der HIT Typ II-Antikörper. Dies wurde durch weitere Untersuchungen bestätigt (Greinacher et al. 1994 c, Kelton et al. 1994, Visentin et al. 1994, Amiral et al. 1995). PF4 ist ein aus 70 Aminosäuren bestehendes Plättchenprotein, das die Form eines Tetrameres besitzt und in den α -Granula der Plättchen gespeichert wird (Brandt et al. 1992). Die

Speicherform besteht aus insgesamt 4 PF4-Tetrameren, verbunden durch ein Proteoglykan-Dimer und wiegt 350 kd (Ziporen et al. 1998). PF4 kann neben Heparin auch eine Reihe weiterer sulfatierter Polysaccharide und negativ geladener Proteine, wie Glykosaminoglykane, binden, was seine hohe Affinität zu Thrombozyten- und Endothelzelloberflächen erklärt (Capitanio et al 1985). Die Bindungsstärke hängt von der Kettenlänge und der Menge der negativen Ladungen im Fall der Polysaccharide also vom Sulfatierungsgrad, ab. Durch Bindung und damit Neutralisation kann PF4 die Bioaktivität von Glykosaminoglykanen modulieren. Auf diese Weise, so wird vermutet, nimmt PF4 Einfluß auf Hämostase und Angiogenese und wirkt modulierend auf das Immunsystem (Ziporen et al. 1998).

Die Immunreaktion ist heparinunspezifisch, da *in vitro* eine Kreuzreaktivität der Heparin/PF4-Antikörper mit weiteren sulfatierten Polysacchariden wie Dextransulfat und Pentosanulfat nachweisbar ist (Greinacher et al. 1992). *In vivo* sind dem HIT Typ II ähnelnde Symptome bei Präparaten wie NMH (Eichinger et al. 1991, Tardy et al. 1991) oder Pentosanpolysulfat (Greinacher et al. 1992, Goad et al. 1994) beschrieben worden.

Ferner ist die Immunreaktion der HIT Typ II polyklonal, d.h. die Heparin/PF4-Antikörper erkennen Epitope mit interindividuell variierender Lokalisation auf den Heparin/PF4-Komplexen. Bis zu vier verschiedene Epitoplokalisationen wurden auf der PF4-Oberfläche identifiziert, die diskontinuierlich sind. Sie entstehen durch Konformationsänderung des PF4-Moleküls bei Bindung von Heparin, wobei sich die Polysaccharidkette des Heparins entlang eines positiv geladenen Ringbandes um das PF4-Tetramer wickelt (Suh et al. 1998, Ziporen et al. 1998).

Für die Auslösung der Immunreaktion bzw. Bildung von Immunkomplexen aus Heparin/PF4-Komplex und Antikörper sind zwei Faktoren von vorrangiger Bedeutung:

Erstens muß der Sulfatierungsgrad der Polysaccharide so groß sein, daß durchschnittlich jeder zweite Saccharidbaustein sulfatiert ist, und die Gesamtkettenlänge muß mindestens 1 kd betragen (Greinacher et al. 1992, Warkentin et al. 1994 a). Zweitens kann eine Immunkomplexbildung *in vitro* nur dann nachgewiesen werden, wenn PF4 und Heparin in einem optimalen molaren Verhältnis vorliegen (Amiral et al. 1995, Greinacher et al. 1994 c, Horsewood et al. 1996). Das Verhältnis der beteiligten Komponenten wird nach Greinacher et al. (1994 c) und Amiral et al. (1995) auf 2:1 [PF4 : Heparin] bis 3:1 bei durchschnittlicher

Heparinmolekülmasse von 10 bzw. 15 kd geschätzt. Horsewood et al. (1996) fanden ein Verhältnis von 4 bis 8:1 bei niedrigerem Molekulargewicht des Heparins.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte muß angenommen werden, daß sich multimolekulare Komplexe aus Heparin und Plättchenfaktor 4 bilden, die nur bei einer bestimmten Konfiguration in Abhängigkeit von einem definierten Verhältnis der Komponenten Epitope exprimieren und damit antigenen Charakter annehmen.

Als Ort der Immunkomplexbildung ist zum einen die Flüssigphase denkbar, aber auch die Thrombozytenoberfläche als Festphase (Warkentin et al. 1994 a). Denn zirkulierendes Heparin kann an auf der Thrombozytenoberfläche exponiertem PF4 binden. Die dort gebildeten multimolekularen Antigenkomplexe (Greinacher et al. 1993 a) stehen in unmittelbarer räumlicher Beziehung zu den FcγIIA-Rezeptoren und können durch Antikörperabsorption eine Plättchenaktivierung verursachen (Warkentin et al. 1994 a). Unphysiologisch hohe Heparindosen können die Antigenkomplexe von der Thrombozytenmembran mobilisieren, und somit die Plättchenaktivierung in vitro unterbinden (Greinacher et al. 1993 a und 1994 a, Sheridan et al. 1986).

Neben der Komplexbildung mit Heparin/PF4-Antigen ist in vitro eine Absorption der Antikörper mit konsekutiver Komplementfixation an Endothelzelloberflächen nachgewiesen worden, die auf einer Kreuzreaktivität mit Heparansulfat beruht, einem dem Heparin chemisch verwandten, sulfatierten Mukopolysaccharid, das Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix der Endothelzellen ist (Cines et al. 1987, Visentin et al. 1994).

Die Bindung der Heparin/PF4-Antikörper an die Endothelzelloberfläche soll eine gesteigerte Freisetzung von Tissue Factor (TF) und verschiedener Inhibitoren des Plasminogenaktivators aus den Endothelzellen bewirken, was eine erhöhte lokale prokoagulatorische Aktivität mit vermehrter Thromboseneigung zur Folge hat (Cines et al. 1987). Aber auch eine durch Komplementaktivierung hervorgerufene Endotheloberflächenläsion mit Thrombozytenaktivierung wird diskutiert (Cines et al. 1987).

2.4.2.3 Genetische Aspekte der HIT Typ II

Mehrfach wurde belegt, daß ein nicht unerheblicher Teil der mit Heparin behandelten Patienten Heparin/PF4-Antikörper mit in vitro plättchenaggregierender Potenz bildet, ohne daß

sich das typische klinische Bild einer HIT Typ II entwickelt (Amiral et al. 1996 b, Warkentin et al. 1994 a, Kelton et al. 1988, Sheridan et al. 1986). Eine Immunantwort allein scheint für die klinische Manifestation nicht ausreichend zu sein, sondern additive Faktoren, unter anderem auch genetische, werden daher diskutiert.

Als mögliche Ursache wird der bekannte Polymorphismus des Fc γ IIA-Rezeptors angesehen: Durch Substitution der Aminosäure Arginin durch Histidin in Position 131 gibt es insgesamt drei Rezeptormutanten. Beide Aminosäuren werden durch zwei Allele codiert, so daß zwei homozygote oder eine heterozygote Variante vorliegen können (Bachelot-Loza et al. 1998).

Heparin/PF4-Antikörper gehören häufiger der Subklasse IgG₁ als IgG₂ an (Arepally et al. 1997, Denomme et al. 1997). Die Subklasse IgG₁ hat generell eine höhere Affinität zum Fc γ IIA-Rezeptor vom homozygoten His/His 131 Phänotyp. Deshalb liegt die Vermutung nahe, daß Patienten mit HIT Typ II häufiger Träger dieses Phänotyps sind (Burgess et al. 1995, Brandt et al. 1995, Bachelot-Loza et al. 1998). Hiermit übereinstimmend konnten Burgess et al. (1995) in einem Kollektiv von HIT-Patienten keinen mit Arg/Arg 131 Phänotyp identifizieren, und Brandt et al. (1995) und Denomme et al. (1997) fanden im Vergleich mit einem Normalkollektiv eine signifikant höhere Inzidenz des His/His 131 Phänotyps bei HIT-Patienten. Daß dieser Phänotyp als "High-Responder" und damit als ein prädiktiver Risikofaktor für eine HIT Typ II angesehen werden muß, konnte jedoch durch andere Studien nicht gestützt werden (Arepally et al. 1997, Bachelot-Loza et al. 1998), weshalb die Bedeutung des Polymorphismus umstritten bleibt.

Für keinen der häufigsten genetischen Faktoren, die mit einem überdurchschnittlich erhöhten Thromboserisiko einhergehen, wie der hereditäre Antithrombin-, Protein C- oder Protein S-Mangel und die APC-Resistenz konnte bisher eine erhöhte Assoziation mit HIT Typ II bewiesen werden (Boshkov et al. 1993, Lee et al. 1998). Gleiches gilt für Antikardiolipin-Antikörper, die für das sogenannte Antiphospholipid-Syndrom, das ähnlich wie die HIT Typ II mit Thrombosen und Thrombozytopenien vergesellschaftet ist, verantwortlich gemacht werden (Gruel et al. 1992).

2.4.2.4 Weitere diskutierte Pathomechanismen der HIT Typ II

Nicht ausreichend geklärt ist das Phänomen, daß trotz plättchenaktivierenden Effekts des Serums nicht bei allen HIT-Patienten Heparin/PF4-Antikörper der Klasse IgG nachweisbar sind (Amiral et al. 1995, Greinacher et al. 1994 a, Arepally et al. 1994).

Ein Erklärungsansatz lieferte Amiral et al. (1996 c), der in derartigen Fällen Heparin/PF4-Antikörper der Klassen IgM und IgA nachweisen konnte. Die Pathogenität dieser Immunglobulinklassen begründete er mit hypothetischen, FcγR-Rezeptor-unabhängigen Mechanismen.

Demnach soll es bei einer thrombinabhängigen Thrombozytenaktivierung zu einer vermehrten Expression von PF4-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche kommen, an die sich Heparin/PF4-Makromoleküle heften können (Capitanio et al. 1985). An diesen Antigen-Rezeptor-Komplex können IgA und IgM mit ihrem F(ab)₂ Fragment binden und dabei via PF4-Rezeptor eine weitere Plättchenstimulation induzieren. Oberflächengebundenes IgM könnte über Komplementfixation und -aktivierung eine Plättchenlyse auslösen.

IgA soll allgemein in der Lage sein, via FcαR Rezeptor neutrophile Granulozyten und Monozyten zu aktivieren. Beide Zellpopulationen werden vermehrt zur Phagozytose angeregt. Amiral et al. (1996 c) vermutet, daß auch Thrombozyten phagozytiert werden. Aktivierte Monozyten schütten zudem Kathepsin G aus, ein plättchenaktivierender Mediatorstoff.

In einzelnen Fällen, in denen trotz plättchenaktivierenden Effekts in vitro keine Heparin/PF4-Antikörper nachweisbar waren, fand Amiral et al. (1996 a) Autoantikörper gegen zwei weitere, dem PF4 strukturell verwandte Vertreter derselben Chemokinfamilie: Interleukin (IL)-8 und Neutrophil Activating Peptid (NAP). Er vermutet zum einen die Möglichkeit, daß Heparin eine Immunantwort gegen diese strukturell dem PF4 vergleichbaren Chemokine induziert, und daß diese Autoantikörper gegen IL-8 und NAP in gleicher Weise wie Heparin/PF4-Antikörper eine FcγR-vermittelte Plättchenaktivierung auslösen können.

IL-8 Autoantikörper sind auch gehäuft mit chronischen Infektionen, malignen und Autoimmunerkrankungen assoziiert, übernehmen hier vermutlich die Funktion einer Inaktivierung des Chemokinpools und wirken dadurch immunsuppressiv. Amiral hält es daher für wahrscheinlicher, daß Heparin aufgrund seiner hohen Affinität zu den Chemokinen diese aus der

Autoantikörperbindung mobilisiert und damit indirekt Effektorzellen wie neutrophile Granulozyten und Endothelzellen und weitere Blutzellen stimuliert. Diese sollen dann Fc γ R Rezeptor unabhängig eine Thrombozytopenie auslösen. Der direkte Beweis dieser Hypothesen ist bis heute noch nicht erbracht.

2.4.3 Klinik der HIT Typ II

Hauptsymptom einer HIT Typ II ist in der Regel die Thrombozytopenie, die fast nie mit einer hämorrhagische Diathese, stattdessen aber überdurchschnittlich oft mit paradoxen thromboembolischen Ereignissen assoziiert ist (Kelton et al 1986, Chong et al. 1989 a, Warkentin et al. 1989).

2.4.3.1 Die Thrombozytopenie

Die Thrombozytopenie setzt charakteristischerweise 5 - 20 Tage nach Beginn der Heparintherapie ein (Warkentin et al. 1995). Ein Plättchenabfall mit Beginn jenseits des achten Tages tritt zwar auch bei einer HIT II auf, ist aber meist anderer Genese (Warkentin 1998 a). Vor dem vierten Therapietag ist das Auftreten einer Thrombopathie aufgrund der immunologischen Pathogenese unwahrscheinlich; jedoch sind Einzelfälle mit schlagartig, innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen nach Therapiebeginn einsetzender Symptomatik beschrieben worden (Ansell et al. 1980, Warkentin et al. 1989, Gruel et al.1990). Als Ursache derartiger Verläufe wird eine Reexposition insbesondere innerhalb der ersten drei Monate nach der Erstgabe vermutet (Cadroy et al. 1994).

Was das Ausmaß des Plättchenabfalls betrifft, so liegen die niedrigsten Plättchenzahlen im Verlauf einer serologisch gesicherten HIT II im Mittel zwischen 50 bis $70 \times 10^3/\mu\text{l}$. Verläufe mit weniger als $20 \times 10^3/\mu\text{l}$ sind selten (Warkentin et al. 1994 a). In anderen Fällen werden Thrombozytenwerte von $150 \times 10^3/\mu\text{l}$ zu keinem Zeitpunkt unterschritten, was insbesondere dann auftritt, wenn der prätherapeutische Wert über die Norm erhöht war (Hach-Wunderle et al. 1997).

In früheren Untersuchungen wurde die HIT von der Mehrzahl der Autoren als ein Abfall der Thrombozyten unter $100 \times 10^3/\mu\text{l}$ definiert (Kelton et al. 1984, Gruel et al 1991, Chong et al. 1989 a und 1995). Neuere Definitionen gehen von einem Thrombozytenabfall von min-

destens 30 - 50 % in Relation zum Ausgangswert vor Therapiebeginn aus (Amiral et al. 1996 b, Greinacher et al. 1999).

Verglichen mit anderen medikamentös induzierten Thrombozytopenien, bei denen Thrombozytenwerte von $15 \times 10^3/\mu\text{l}$ und weniger keine Seltenheit sind (Pedersen-Bjergaard et al. 1997), kommt es bei der HIT Typ II zu einer eher geringen Erniedrigung der Thrombozytenzahl, die im Gegensatz zu anderen nur sehr selten durch hämorrhagische Blutungen kompliziert ist (Kelton et al. 1986, Warkentin et al. 1989 und 1991). Zu einer Normalisierung der Thrombozytenzahlen kommt es in der Regel erst nach dem Absetzen der Heparintherapie innerhalb von 7 - 10 Tagen (Cines et al. 1987, Warkentin 1989).

2.4.3.2 HIT Typ II mit Thrombosen

Schätzungsweise 20 bis 50% aller Patienten entwickeln im Verlauf einer HIT Typ II eine Thrombose (Warkentin et al. 1995). Sowohl venöse als auch arterielle Thrombosen können zeitgleich mit der Thrombozytopenie auftreten. Entgegen früherer Einschätzungen, daß periphere arterielle Verschlüsse bei der HIT häufiger sind als venöse Thrombosen (Cimo et al. 1979, Towne et al. 1979), fanden neuere retrospektive Untersuchungen in einem unselektierten Patientengut ein deutliches Übergewicht venöser Thrombosen mit einem Verhältnis von 4:1 (Warkentin et al. 1995 und 1996 b). Die Inzidenz der Lungenembolien allein war höher als die aller arteriellen Ereignisse zusammen.

Arterielle Thrombosen sind meistens im Bereich der großen Becken- und Beinarterien lokalisiert und führen zu akuter Ischämie der betroffenen Extremität (King 1984, Kelton 1986, Warkentin 1989). Aber auch andere arterielle Verschlusslokalisationen wie Myokardinfarkte und akute zerebrovaskuläre Insulte wurden beschrieben, allerdings mit einer niedrigeren Inzidenz als akute Extremitätenischämien (Boshkov et al. 1993). Da die arteriellen Thromben hauptsächlich aus Thrombozytenaggregaten bestehen, hat ihr charakteristisch helles Aussehen der HIT Typ II auch die Bezeichnung "white clot syndrome" eingebracht (King 1984, Kelton 1986).

Venöse thromboembolische Ereignisse sind häufig tiefe Beinvenenthrombosen, Lungenembolien oder seltener Sinusvenenthrombosen. (Kelton et al. 1984, Chong et al. 1989 a, Warkentin et al. 1991). Besonders die Inzidenz von Lungenembolien in Relation zu anderen ve-

nösen thromboembolischen Ereignissen wird unter einer HIT Typ II vergleichsweise viel höher eingeschätzt als bei Ereignissen anderer Ursache (Warkentin et al. 1996 b).

Eine nicht so häufige, aber wichtige Komplikation ist der meist beidseitige durch venöse Verschlüsse bedingte hämorrhagische Nebennierenrindeninfrakt, der sich klinisch durch die Symptome eines Addison-Syndroms manifestiert (Ernest et al. 1991).

2.4.3.3 Weitere klinische Manifestationen

Neben Thrombozytopenien und Thrombosen sind noch weitere klinische Manifestationen im Zusammenhang mit einer HIT Typ II bekannt geworden, wie z.B. lokal begrenzte Hautläsionen an den Injektionsstellen von subkutan appliziertem Heparin (Warkentin und Kelton 1994 a). Derartige Hautläsionen können sich entweder als schmerzhafte erythematöse Plaques oder Hautnekrosen äußern und müssen nicht zwangsläufig mit einer Thrombozytopenie oder Thrombose vergesellschaftet sein, sind aber in fast allen Fällen nachweislich mit HIT-spezifischen Antikörpern assoziiert (Warkentin et al. 1996 c).

Bei intravenöser Heparinbolusgabe wurde gelegentlich eine akute systemische Reaktion beschrieben, die einer Transfusionsreaktion ähnelt und durch Symptome wie Schüttelfrost, Hypotension, Tachykardie und Nausea charakterisiert ist (Warkentin et al. 1994 b). Sie kann bereits 10 Minuten nach Injektion auftreten und geht mit einem abrupten Plättchenabfall einher. Als Ursache wird eine bereits vorbestehende Sensibilisierung durch frühere Heparinexpositionen angenommen. Im Rahmen solcher akuten systemischen Reaktionen unter Heparinbolusgabe sind auch mangel durchblutungsbedingte transiente globale Amnesien, ein amnestisches Syndrom mit plötzlich einsetzenden anterograden und retrograden Gedächtnisstörungen, beobachtet worden (Warkentin et al. 1994 b).

Diese eher untypischen klinischen Manifestationen sind nicht zuletzt deshalb bedeutsam, weil sie als Prädiktoren bzw. Warnsignale drohender thromboembolischer Komplikationen zu betrachten sind.

2.4.4 Diagnostik der HIT Typ II

2.4.4.1 Bedeutung der Diagnostik

Bei Verdacht auf eine HIT Typ II ist eine unverzügliche und zuverlässige Sicherung der Diagnose wünschenswert, weil sie wichtige Entscheidungen für das weitere therapeutische Prozedere impliziert. Da bislang keine schnellen und zuverlässigen Tests verfügbar sind, müssen in der Praxis therapeutische Maßnahmen zur Abwendung der schwerwiegenden Komplikationen der HIT Typ II schon auf Verdacht ergriffen werden. Bei nicht eindeutiger Konstellation ist stets geboten, neben der HIT Typ II eine Reihe weiterer mit Thrombozytopenien einhergehender, differentialdiagnostisch bedeutsamer Erkrankungen auszuschließen:

1. Eine Pseudothrombozytopenie, die artifiziell in vitro durch Interaktion der Thrombozyten mit EDTA-Pufferlösung entsteht, kann durch parallele Plättchenzählung im Zitratblut ausgeschlossen werden (Huss et al. 1995).
2. Eine Verbrauchkoagulopathie, die durch eine heterogene Gruppe pathologischer Situationen, wie Sepsis, maligne Erkrankungen, Trauma, und Transfusionsreaktionen ausgelöst wird und charakterisiert ist durch vermehrten Verbrauch von Gerinnungsfaktoren sowie Thrombozyten kann, durch verlängerte "globale" Gerinnungstests und vermehrte Fibrin-spaltprodukte (Warkentin et al. 1989, Chong et al. 1989 a) nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden.
3. Die Autoimmunthrombozytopenie (ITP), die als akute Form postinfektiös bei Kindern unter 10 Jahren oder als chronische Form bei Erwachsenen durch Sensibilisierung mit Auto-Immunglobulinen gegen das Oberflächenprotein GP IIb/IIIa ausgelöst wird, läßt sich durch Bestimmung von antithrombozytären Antikörpern nachweisen (George et al. 1996).
4. Andere Medikament-induzierte Immunthrombozytopenien, z.B. durch Chinin, Chinidin, Co-Trimoxazol, Rifampicin, Paracetamol, Diclofenac, Carbamazepin und andere, bilden sich durch Absetzen zurück (Kiefel 1999).

Aufgrund der Vielzahl der Differentialdiagnosen scheint eine möglichst schnelle, sensitive und spezifische Labormethode unverzichtbar. Seit Entdeckung der HIT Typ II sind eine Reihe von Testmethoden entwickelt worden, die sich in zwei große Gruppen einteilen lassen:

sen: funktionelle Assays und Immunoassays.

2.4.4.2 Funktionelle Assays

Funktionelle Assays verfolgen generell das Prinzip des indirekten Nachweises der HIT- Antikörper durch Induktion der Plättchenaggregation oder durch Freisetzung von Plättchenproteinen. Alle funktionellen Tests können nur mit Hilfe von Spenderthrombozyten durchgeführt werden, so daß die Methodik stets aufwendig ist und häufig nur in Assoziation mit transfusionsmedizinischen Abteilungen durchgeführt werden kann.

Die am meisten verbreiteten Tests sind der Serotonin-Release-Assay (SRA) von Sheridan et al. (1986), der Heparin-induzierte Plättchenaktivierungstest (HIPA) von Greinacher et al. (1991) und der Plättchenaggregationstest (PAT) von Kelton et al. (1984).

Der Plättchenaggregationstest (PAT) nutzte als erste in vitro Methode zur Diagnostik der HIT die heparinspezifische, plättchenaggregierende Eigenschaft von HIT-Seren, indem die Aggregation von Spenderthrombozyten bei einer Heparinkonzentration von 0,5 U/ml photometrisch quantifiziert wurde (Fratantoni et al. 1975, Kelton et al. 1984, Carreras et al. 1980). Er ist von allen funktionellen Tests in der Durchführung am einfachsten, insbesondere weil die Plättchen in den meisten Labors vor Gebrauch keiner aufwendigen Waschung unterzogen werden. Jedoch ist seine Sensitivität ungenügend, da sie in Abhängigkeit von der Spenderthrombozytenreaktivität zwischen 39 % und 81 % variiert. Die Spezifität wird in Abhängigkeit von der Art des untersuchten Kontrollkollektives zwischen 90 und 100 % angegeben (Kelton et al. 1984, Chong et al. 1993 a).

Nicht die Aggregation sondern die Freisetzung von radioaktiv markiertem Serotonin aus den α -Granula als Maß der Plättchenaktivierung untersucht der Serotonin Release Assay (SRA) von Sheridan et al. (1985) und erreicht mit 65 - 94 % in Abhängigkeit von den Spenderthrombozyten ein bessere Sensitivität als der PAT (Chong et al. 1993 a). Die höhere Sensitivität ist darauf zurückgeführt worden, daß es bei einer immunologischen Plättchenstimulation leichter zu einer Degranulation als zu einer Aggregation kommt (Sheridan et al. 1985). Weitere Untersuchungen legen aber nahe, daß die Verbesserung primär auf das Waschen der Thrombozyten zurückzuführen ist, da auf diese Weise reaktionshemmende Plasmafraktionen eliminiert werden (Chong et al. 1993 a, Greinacher et al. 1991). Die Spezifität konnte vor

allem mit Hilfe der sogenannten Zwei-Punkt-Meßmethode deutlich verbessert werden (Sheridan et al. 1985, Chong et al. 1993 a). Hierbei wird mit einer niedrigen Heparinkonzentration von 0,1 - 1,0 U/ml und einer hohen von 10 - 100 U/ml gemessen. Während es bei der niedrigen Heparinkonzentration durch HIT-Seren zu einer ausgeprägten Plättchenaktivierung kommt, wird diese durch die unphysiologisch hohe Heparinkonzentration gehemmt. Der Leistungsvorteil des SRA wird jedoch durch eine schlechte Praktikabilität erkauft, denn er ist zeitaufwendig und verlangt den Einsatz von radioaktivem Material, was seine Anwendung zumeist auf Forschungszwecke beschränkt hat (Greinacher et al. 1991, Chong 1993 a).

Der Heparin-induzierte Plättchenaktivierungstest (HIPA) von Greinacher et al. (1991) ist der am weitesten verbreitete funktionelle Test in Deutschland (Eichler et al. 1999). Auch hier werden gewaschene Plättchen eingesetzt. Es kann jedoch auf radioaktive Substanzen verzichtet werden. Die Auswertung erfolgt makroskopisch durch Beurteilung der Aggregatbildung in einer Mikrotiterplatte, was die parallele Durchführung einer großen Zahl von Testungen ermöglicht. Eine Probe wird mit Thrombozyten von vier verschiedenen Spendern getestet, um die interindividuellen Schwankungen in der Plättchenreaktivität auszugleichen.

Die Sensitivität wurde in vergleichenden Untersuchungen genau so hoch bewertet wie die des SRA und deutlich besser als die des PAT (Greinacher et al. 1991 und 1994 a). Aber auch die Praktikabilität des HIPA ist problematisch, wie eine multizentrische Studie in mehreren Labors beweist, in der 8 unterschiedliche Seren mit dem HIPA auf HIT-Antikörper getestet wurden (Eichler et al. 1999). Von neun Labors wurden zwei aus der Studie ausgeschlossen, weil eine sehr hohe Diskrepanz der Ergebnisse inakzeptable Schwächen in der Durchführung vermuten ließ. Von den restlichen 7 Labors erzielten nur 2 konkordante Ergebnisse.

Weitere, weniger erprobte funktionelle Assays sind die Luminiszenz-Aggregometrie von Stewart et al. (1995) und die durchflußzytometrische Messung von HIT-Antikörper-induzierten Mikropartikeln von Lee et al. (1996), die beide annähernd die Sensitivität und Spezifität des SRA erreichten. Die Luminiszenz-Aggregometrie weißt mittels des enzymatischen Luziferin-Luziferase-Systems durch Aktivierung aus den α -Granula der Spenderplättchen freigesetztes ATP nach, ähnelt also dem Prinzip des SRA, ohne daß aber radioaktive Tracer eingesetzt werden. Die durchflußzytometrische Methode weist die spezifischen

Streulichteigenschaften der *in vitro* Phänomene der HIT-Antikörper-induzierten Bildung von Thrombozytenaggregaten und thrombozytären Mikropartikeln nach (Warkentin et al. 1994 a).

2.4.4.3 Immunoassays

Immunoassays weisen anders als funktionelle Assays, die für HIT Typ II spezifischen Heparin/PF4-Antikörper direkt nach, indem die Immunglobuline aus einer Flüssigphase an eine Festphase durch Immunkonjugation absorbiert und dort mit Hilfe von antihumanen Antikörpern detektiert werden. Sie zeichnen sich durch eine gute Praktikabilität aus und sind daher auch in nicht spezialisierten Labors durchführbar.

Als das Hauptantigen, der Heparin/PF4-Komplex, noch nicht identifiziert war, fixierte man Plättchen von Spendern auf einer Mikrotiterplatte und inkubierte HIT-Seren mit Heparin in definierter Ratio (Howe et al. 1985; Gruel et al. 1991). Dieser Ansatz war bezüglich seiner Spezifität erfolgreich. Jedoch hat sich auch hier, wie bei den funktionellen Tests, eine Inkonsistenz in der Reliabilität gezeigt, deren Ursache vermutlich in der interindividuellen Variabilität der Spenderplättchen zu suchen ist und die Sensitivität bei Verwendung weniger reaktiver Plättchen ungünstig beeinflussen kann (Gruel et al. 1991).

Kommerziell erhältlich und am weitesten verbreitet ist der Heparin/PF4-Immunoassay (HPF4-ELISA) von Amiral et al. (1992). Dieser Test weist Heparin/PF4-Antikörper der Immunglobulinklassen IgG, IgM und IgA nach. Gemessen am Serotonin-Release-Assay (SRA) liegt seine Sensitivität bei 90 %, (Arepally et al. 1995), d.h. daß der HPF4-ELISA in 10 % der Fälle ein negatives Ergebnis fand, das der Serotonin-Release-Assay zuvor als positiv wertete. Andererseits wurden in fast 10 % der Fälle mit positivem HPF4-ELISA Ergebnis ein negativer SRA gefunden, so daß der Anteil der diskrepanten Ergebnisse insgesamt bei fast 20 % liegt. Vergleiche der Sensitivität mit dem Heparin-induzierten Plättchen-Aktivierungstest (HIPA) kamen zu tendenziell ähnlichen Ergebnissen: In einer prospektiven Untersuchung war die Sensitivität beider Test als vergleichbar gewertet worden, jedoch lag hier der Anteil der als diskrepant gewerteten Ergebnisse sogar bei fast 40 % (Greinacher et al. 1994 a). Hingegen war die Sensitivität des Heparin/PF4-EIA der des Plättchenaggregationstests (PAT) deutlich überlegen. Über 50 % aller im Heparin/PF4-EIA positiven Ergebnisse wurden vom PAT nicht identifiziert. Der Heparin/PF4-EIA verfehlte nur 2 % der positi-

ven Ergebnisse des PAT. Im Gegensatz zu Greinacher et al. (1994 a) fanden Look et al. (1997) unter Verwendung desselben Heparin/PF4-EIA und des identischen Protokolls den PAT mit 91 % deutlich sensitiver als den Heparin/PF4-EIA (60%). In dieser vergleichenden Untersuchung waren nur 52 % aller positiven Ergebnisse konkordant. Zusammenfassend besteht eine offensichtliche Diskrepanz zwischen dem exemplarisch dargestellten, immunologischen HPF4-EIA und den aufgeführten funktionellen Tests, insbesondere die Spezifität betreffend. Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, dass die Testtypen unterschiedliche in vitro Phänomene messen.

2.4.5 Therapie der HIT Typ II

Es hat sich gezeigt, daß Patienten, die unter Heparin eine isolierte HIT Typ II ohne thromboembolische Komplikationen entwickelten, auch nach Beendigung der Heparintherapie ein deutlich erhöhtes Thromboserisiko haben (Warkentin et al. 1995, Warkentin 1996 b). Daher reicht in dieser Situation das Absetzen allein nicht aus, sondern Heparin muß durch ein alternatives Antikoagulum ersetzt werden.

Niedermolekulare Heparine können deshalb nicht als Alternative empfohlen werden, weil sensitive in vitro Testmethoden eine Kreuzreaktivität mit den heparin-induzierten Antikörpern in mehr als 90 % der Fälle zeigen (Greinacher et al. 1991 und 1992).

In vivo Erfahrungen mit NMH zeigten in Einzelfällen eine erfolgreiche Anwendung, insgesamt ist aber mit einer unverhältnismäßig hohen Versagerquote zu rechnen (Vitoux et al. 1986, Warkentin et Kelton 1989, Kikta et al. 1993).

Orale Antikoagulantien wie Warfarin sind in der akuten thrombopenischen Phase der HIT Typ II wegen des langsamen Wirkungseintritts ungeeignet bzw. sogar kontraindiziert (Warkentin et al. 1996 b und 1997), da Vitamin-K Antagonisten zu Beginn stärker die Bildung von Protein C hemmen. Dadurch kann es zu einer Dysbalance zugunsten prokoagulatorischer Faktoren kommen, so daß gelegentlich vermutlich auf dem Boden einer vorbestehenden Thrombose eine venöse Extremitätengangrän auftritt (Warkentin et al. 1997).

Die wichtigsten Optionen in der alternativen Antikoagulation sind Danaparoid und rekombinantes Hirudin, deren Effizienz in größeren Studien bewiesen wurde (Magnani 1993, Chong 1996 a, Greinacher et al 1999).

Danaparoid (*Orgaran*®) ist ein Gemisch aus vorzugsweise niedrig sulfatierten Heparan- und Dermatan sulfaten mit antikoagulatorischer Wirkung, das in der Mehrzahl der behandelten Fälle erfolgreich ist (Magnani 1993, Warkentin 1996 a). Die gute Wirksamkeit von Danaparoid bei HIT erklärt sich durch die Hemmung des Faktor Xa (Warkentin 1996 a). Ein Nachteil ist vor allem das potentielle Risiko einer in vivo Kreuzreaktivität mit Heparin, das allerdings mit geschätzten 3 % verhältnismäßig niedrig ist (Magnani 1993, Warkentin 1996 a). In vitro ist allerdings in etwa 10 % der Fälle eine Kreuzreaktivität nachweisbar, die klinisch jedoch meist keine wesentliche Rolle zu spielen scheint (Greinacher et al. 1991 und 1992).

Auch Hirudin, das natürlicherweise aus den Speicheldrüsen des Blutegels (*Hirudo medicinalis*) gewonnen wird, konnte besonders in Deutschland bei vielen HIT-Patienten erfolgreich angewendet werden (Greinacher et al. 1995 b, 1996 a und 1999, Schiele et al 1995). Die handelsüblichen Präparate (*Refludan*®, *Revasc*® etc.) werden gentechnisch mit rekombinanten Verfahren hergestellt. Die antikoagulatorische Wirkung entsteht durch Komplexbildung mit Thrombin. Aufgrund seiner andersartigen chemischen Struktur sind Kreuzreaktionen mit Heparin nicht möglich, jedoch wurden bei etwa der Hälfte der Patienten, die Hirudin länger als 5 Tage erhielten, anti-Hirudin-Antikörper nachgewiesen (Huhle et al. 1999). Die gebildeten Immunkomplexe werden schlechter renal eliminiert, so daß eine Dosisreduktion vorgenommen werden muß.

Der therapeutische Nutzen von Acetylsalicylsäure (Janson et al. 1983), genauso wie die Plasmapherese (Brady et al. 1991) oder die hochdosierte intravenöse Gabe von Gammaglobulinen (Greinacher et al. 1994 b) ist nicht so eindeutig bewiesen wie bei Hirudin und Danaparoid, kann aber in individuellen Fällen als supportive Maßnahme hilfreich sein.

3. Patienten

3.1 Patientenkollektive

Im Zeitraum von März 1995 bis Juli 1998 wurden dem Gerinnungslabor der Angiologischen Abteilung der Universitätsklinik der J.W. Goethe-Universität in Frankfurt Blutproben von insgesamt 182 Patienten von Krankenhäusern aus dem gesamten Rhein-Main-Gebiet zugesandt, bei denen der Verdacht einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ II bestand. Bei 45 Patienten konnte diese Diagnose klinisch sowie entweder durch ein positives Ergebnis im HPF4-ELISA (Amiral al. 1992) oder HIPA-Test (Greinacher et al. 1991) oder aber in der Mehrzahl der Fälle durch beide Teste bestätigt werden.

Die klinischen Daten, wie Thrombozytenverläufe, Heparintherapiedauer etc. wurden von den behandelnden Abteilungen durch Zusenden der Arztbriefe übermittelt, bzw. durch nachträgliche Recherche in den Krankenblättern der jeweiligen Krankenhausarchive vervollständigt, soweit dies notwendig oder möglich war.

Die Patienten der Gruppen I, II und IV stammten alle aus dem oben erwähnten Kollektiv und wurden retrospektiv nach den Kriterien eingeteilt, die im Kapitel 3.2. näher beschrieben sind.

Die Patienten der Gruppe III wurden aus einer prospektiven Studie zusammengestellt, in der bei 50 gefäßchirurgischen konsekutiven Patienten die Inzidenz von Heparin/PF4-Antikörpern und HIT Typ II während einer Heparintherapie mit einer Dauer von länger als 5 Tagen untersucht wurde (Lindhoff-Last et al. 2000).

3.2 Gruppendefinitionen

3.2.1 Gruppe I - HIT Typ II mit Thrombosen

Die Patienten der Gruppe I mußten folgende Einschlußkriterien erfüllen:

- a) Absinken der Thrombozytenzahl um mehr als 50 % im Vergleich zum Ausgangswert vor Therapie frühestens 5 Tage nach Beginn mit Heparin
- b) mindestens ein positives Ergebnis entweder im HIPA-Test oder Heparin/PF4-ELISA, das im zeitlichen Zusammenhang mit dem klinischen Bild auftrat

- c) Wiederanstieg der Thrombozyten nach Beendigung der Heparintherapie
- d) klinisch manifeste und diagnostisch nachgewiesene venöse und/oder arterielle thromboembolische Komplikationen unter der Heparintherapie, zeitlich assoziiert mit der Thrombozytopenie

3.2.2 Gruppe II – HIT Typ II ohne Thrombosen

Die Patienten der Gruppe II mußten folgende Kriterien erfüllen:

- a) Absinken der Thrombozyten um mehr als 50 % im Vergleich zum Ausgangswert vor Therapie frühestens 5 Tage nach Beginn mit Heparin
- b) Mindestens ein positives Ergebnis entweder im HIPA-Test oder Heparin/PF4-ELISA, das im zeitlichen Zusammenhang mit dem klinischen Bild auftrat
- c) Wiederanstieg der Thrombozyten nach Beendigung der Heparintherapie
- d) jedoch **keine** venösen oder arteriellen thromboembolischen Komplikationen

3.2.3 Gruppe III

Die Patienten der Gruppe III mußten folgende Kriterien erfüllen:

- a) Teilnahme an der prospektiven Studie (Lindhoff-Last et al. 2000), in der gefäßchirurgische Patienten auf die Inzidenz von Heparin/PF4-Antikörper und HIT Typ II untersucht wurden
- b) kein Abfall der Thrombozytenzahl um mehr als 50% im Vergleich zum Ausgangswert vor Beginn der Heparintherapie
- c) keine venösen oder arteriellen thromboembolischen Komplikationen mit gleichzeitiger Thrombozytopenie unter der Heparintherapie
- d) positiver Nachweis von Heparin/PF4-Antikörper unter der Heparintherapie

3.2.4 Gruppe IV

Patienten, die mit Verdacht auf HIT II zugewiesen wurden und folgende Kriterien erfüllten:

- a) Thrombozytenabfall um mehr als 50% während einer Heparintherapie frühestens fünf Tage nach Behandlungsbeginn
- b) Anstieg der Thrombozytenzahlen auf Normalwerte trotz Fortsetzung der Heparintherapie

- c) Weder im HIPA-Test noch im HPF4-ELISA ein positives Ergebnis zeitlich assoziiert mit der Thrombozytopenie
- d) Primärerkrankungen, klinische Befunde und Laborbefunde, die das Vorliegen einer anderen Ursache der Thrombozytopenie wahrscheinlich machten.

3.3 Klinische Charakteristika der Gruppen

3.3.1 Gruppe I

Die Anzahl der in dieser Gruppe retrospektiv untersuchten Patienten betrug 32. Es bestand bezüglich der Geschlechterverteilung mit 22 zu 10 ein deutliches Ungleichgewicht zu Gunsten der Frauen. Das Durchschnittsalter des Kollektives lag zum Untersuchungszeitpunkt bei 63,9 (SD \pm 9,8) Jahren, wobei kein deutlicher Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Patienten zu verzeichnen war (siehe Tab. 3.1., S. 29).

19 Patienten mit orthopädischen oder traumatologischen Eingriffen stellten das größte Kollektiv dar: 9 traumatologische Patienten mit Oberschenkelhalsfraktur (5), Oberschenkel-schaftfraktur (2) oder Tibiakopffraktur (2) wurden operativ osteosynthetisch oder endoprothetisch behandelt, 2 traumatologische Patienten mit multiplen Prellungen konservativ. 8 orthopädische Patienten litten an degenerativen Gelenkerkrankungen der Hüften oder der Knie, die alle endoprothetisch versorgt wurden.

Mit 11 Patienten an zweiter Stelle standen kardiovaskuläre Erkrankungen: Von 6 Patienten mit kardialen Erkrankungen wurden 2 einer Koronarbybypassoperation unter Einsatz eines extrakorporalen Kreislaufs unterzogen, 1 Patient wurde im Rahmen einer systemischen Lysetherapie bei Myokardinfarkt unter anderem auch mit Heparin behandelt, 3 Patienten wurden prophylaktisch mit Heparin behandelt, außerdem 2 Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose, 1 Patient mit arteriellen Embolien der Beine, der embolektomiert wurde, und ein Patient mit reseziertem Femoralisaneurysma.

Neben den beiden genannten Gruppen gab es zwei gynäkologische Patientinnen, die hysterektomiert wurden.

Die Dauer der Heparintherapie betrug im Mittel 14,8 (SD \pm 5,5) Tage. Diese Medikation wurde abgesetzt, sobald sich die Verdachtsdiagnose aufgrund klinischer Ereignisse ergab.

5 Patienten erhielten von Beginn an durchschnittlich 8,4 Tage niedermolekulares Heparin (NMH), wurden dann aber bei Thrombosemanifestation auf unfraktioniertes Heparin (UFH) umgestellt. Alle übrigen 27 Patienten bekamen von Beginn an UFH. In 4 Fällen (Beinvenenthrombose, Thrombembolie und systemische Lyse) wurde Heparin in therapeutischer Dosierung verabreicht, ansonsten prophylaktisch.

Die Thrombozytenwerte betragen vor Therapiebeginn durchschnittlich $262 (SD \pm 85) \times 10^3/\mu\text{l}$, fielen frühestens nach fünf Tagen um mehr als 50 % ab und erreichten einen durchschnittlichen Nadir von $58 (SD \pm 33) \times 10^3/\mu\text{l}$ nach 13,4 (SD $\pm 4,5$) Tagen. Das entsprach einem relativem Abfall von 77,9 %.

Nach Beendigung der Heparintherapie war bei allen Patienten eine rasche Erholung der Thrombozytenwerte innerhalb von wenigen Tagen zu beobachten.

Rein arterielle thromboembolische Ereignisse wurden bei insgesamt 10 Patienten klinisch apparent, während 14 Patienten ausschließlich venöse Thrombosen entwickelten und bei 8 Patienten beide Formen auftraten. 4 Patienten mit venöser Thrombose entwickelten konsekutiv eine klinisch relevante Lungenembolie.

Arterielle Thrombosen waren überwiegend im aortoiliakalen und femoropoplitealen Strömungsgebiet lokalisiert, aber auch jeweils einmal in den Mesenterialgefäßen, der Karotisgabel, Koronar- und Armarterie und manifestierten sich durchschnittlich 10,9 (SD $\pm 3,6$) Tage nach Therapiebeginn. Bei zwei Patienten kam es nach Thrombektomie unter Fortsetzung der Heparintherapie zu Rezidivthrombosen derselben Lokalisation.

Venöse Thrombosen, die im Mittel am Tag 12,4 (SD $\pm 3,6$) der Therapie diagnostiziert wurden, fanden sich im Becken-, Ober- und Unterschenkelbereich und bei einem Patienten im Bereich der Sinusvenen.

Alle thrombembolischen Ereignisse wurden durch apparative Diagnostik, wie Angiographie, Phlebographie, Duplex-Sonographie und Lungenperfusionsszintigraphie bzw. durch Autopsie gesichert.

7 Patienten verstarben an den Folgen der HIT Typ II (21,9 %), 6 Patienten (18,8 %) behielten bleibende Schäden wie Gliedmaßenamputation oder Halbseitenlähmung zurück.

3.3.2 Gruppe II

Diese Gruppe umfaßte insgesamt 13 retrospektiv analysierte Patienten, deren Durchschnittsalter 65,5 (SD \pm 16,7) Jahre betrug, also nur geringfügig über dem der Gruppe I lag. Die Geschlechtsverteilung war mit 9 zu 4 ähnlich zu Gunsten der Frauen ausgeprägt wie in Gruppe I (siehe Abb. 3.1., S. 29).

Auch bezüglich der Primärdiagnose, die zur Heparintherapie führte, gab es Parallelen zu der ersten Gruppe, denn bei dem überwiegenden Teil handelte es sich ebenfalls um traumatologisch- orthopädische oder kardiovaskuläre Erkrankungen. 4 Patienten erhielten prophylaktisch Heparin im Rahmen einer Hüftoperation mit endoprothetischem Ersatz, 4 Patienten litten an einer oder mehreren Herzerkrankungen wie z.B. KHK, Herzinsuffizienz, oder Rhythmusstörungen, von denen 3 Patienten einer Operation am offenen Herzen unterzogen wurden. In zwei Fällen, bei einer perkutanen transluminalen Angioplastie mit lokaler Lyse eines akuten peripheren arteriellen Verschlusses und bei einer Phlebothrombose mit konsekutiver Lungenembolie, wurde Heparin in therapeutischer Dosierung angewandt- bei den übrigen zur Prophylaxe.

Die Heparintherapie dauerte im Mittel 10,8 (SD \pm 7,1) Tage und wurde in der Regel bei Auftreten der Verdachtsdiagnose HIT Typ II beendet. Auch in dieser Gruppe entwickelten zwei Patienten unter zeitweiliger Gabe von NMH (Dauer 2 bzw. 7 Tage) eine Thrombozytopenie, jedoch wurde bei beiden erst im Verlauf von UFH auf NMH umgestellt.

Die Thrombozytenzahlen lagen im Mittel vor Therapiebeginn mit 249 (SD \pm 126) $\times 10^3/\mu\text{l}$ auf vergleichbarem Niveau der Gruppe I. Mit 49 (SD \pm 21) $\times 10^3/\mu\text{l}$ lag der gemittelte Nadir etwas unter dem der Gruppe I, so daß der relative Abfall mit 80,3 % geringfügig höher war als in Gruppe I.

Der Zeitpunkt des Nadirs lag im Mittel mit 11,4 (SD \pm 5,7) Tagen zwei Tage vor dem der Gruppe I.

Zum Ausschluß einer Thrombose wurden bei allen Patienten regelmäßige, klinische Untersuchungen empfohlen, und in 4 Fällen wurde zusätzlich eine Duplexsonographie der Beinvenen durchgeführt.

Keiner der Patienten verstarb an den Folgen der HIT Typ II oder trug bleibende Schäden davon.

3.3.3 Gruppe III

Die 24 prospektiv untersuchten Patienten hatten ein Durchschnittsalter von 63,9 (SD \pm 12,2) Jahren. Bezüglich des Geschlechts ergab sich mit einem deutlichen Übergewicht der Männer von 20 zu 4 ein im Vergleich zu den Gruppen I und II umgekehrtes Verhältnis (siehe Tab. 3.1., S. 29).

Das vorselektierte Kollektiv bestand ausschließlich aus gefäßchirurgischen Patienten: 16 Patienten wurden wegen einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und 8 Patienten wegen eines Bauchaortenaneurysmas operativ behandelt. Die Heparintherapie dauerte bei allen Patienten länger als 5 Tage, im Schnitt 12,7 (SD \pm 3,8), peri- und postoperativ beginnend mit UFH, das dann nach etwa 7 Tagen ersetzt wurde durch niedermolekulares Heparin (NMH).

Zum Auschluss einer Thrombozytopenie mit einem Abfall unter die definierte Grenze erfolgten tägliche Blutbildkontrollen. Die niedrigsten frühestens nach 5 Tagen gemessenen Werte lagen bei $246 (SD \pm 78) \times 10^3/\mu\text{l}$ und somit höher als jene vor Therapiebeginn ($23 \times 10^3/\mu\text{l}$ $8 (SD \pm 78) \times 10^3/\mu\text{l}$).

Thrombembolische Ereignisse wurden durch regelmäßige klinische Untersuchungen, sowie durch eine bei allen Patienten direkt vor Entlassung durchgeführte Farbduplex-Sonographie der Beinvenen und eine Doppleruntersuchung der Beinarterien beidseitig ausgeschlossen.

3.3.4 Gruppe IV

Das Durchschnittsalter der 20 Patienten der Gruppe 4 lag mit 59,9 Jahren (SD \pm 11,7) unter dem aller anderen Patientengruppen. Die Geschlechtsverteilung war mit 10 zu 10 ausgeglichen (siehe Tab. 3.1., S. 29).

Die Primär Diagnosen und deren Verteilung ähnelten den Gruppen I und II. Die meisten Patienten (12) waren wegen kardiovaskulärer Erkrankungen stationär eingewiesen worden: 2 Patienten mit schwerer koronarer Herzerkrankung, die einer Bypassoperation unterzogen wurden, 2 Patienten mit Bauchaortenaneurysma. 2 Patienten mit arterieller Verschlusskrank-

heit des Beines bzw. der Carotis, die ebenfalls alle operativ behandelt wurden. 2 Patienten mit jeweils Endokarditis und dilatativer Kardiomyopathie wurden konservativ behandelt.

Mit 4 Patienten an zweiter Stelle lagen Primärerkrankungen aus dem orthopädisch- traumatischen Bereich: alle mit osteosynthetischem bzw. endoprothetischem Eingriff, 3 davon ursächlich wegen traumatischer Schenkelhalsfraktur.

Daneben lagen diverse andere Erkrankungen zu Grunde wie Meningitis bei AIDS, systemischer Lupus erythematoses (SLE), Divertikulitis mit Peritonitis, und Arzneimittelexanthem, bei denen zusammengefaßt charakteristischerweise ein entzündliches bzw. immunologisches Geschehen im Vordergrund stand.

Die Heparintherapie dauerte in dieser Gruppe mit durchschnittlich 30,3 (SD \pm 19,9) Tagen deutlich länger als in den anderen Gruppen und damit auch bei allen Patienten länger als die thrombozytopenische Phase: Die Thrombozytenwerte waren im Mittel 22 (SD \pm 9) Tage nach Beginn der Therapie wieder auf das Niveau der Ausgangswerte gestiegen; d.h. bei allen Patienten war ein Wiederanstieg der Thrombozytenzahlen trotz fortbestehender Heparintherapie nachweisbar. Der prätherapeutische Wert der Thrombozyten betrug im Mittel 221 (SD \pm 127) $\times 10^3/\mu\text{l}$ und fiel innerhalb von 13,2 (SD \pm 6,9) Tagen nach Therapiebeginn auf $70 \times 10^3/\mu\text{l}$, d.h. um 68 % ab.

Drei Patienten entwickelten trotz Antikoagulation eine tiefe Beinvenenthrombose nach durchschnittlich 11 Tagen. Bei allen anderen Patienten wurden keine thrombembolischen Komplikationen klinisch apparent.

| | N | Alter (Jahre) MW ± SD | Geschlecht (M/F) | Prätherapeut. Plättchen- zahl (× 10 ³ /μl) MW ± SD | Nadir Plättchen- zahl (× 10 ³ /μl) MW ± SD | Dauer der Heparin- therapie (Tage) MW ± SD |
|---|-----------|---------------------------------|---------------------|---|---|--|
| Gruppe I HIT mit throm- botischen Komplikationen | 32 | 64 ± 13 | 10/22 | 262 ± 85 | 58 ± 34 | 14,8 ± 5,5 |
| Gruppe II HIT ohne thrombotische Komplikationen | 13 | 66 ± 17 | 4/9 | 249 ± 126 | 49 ± 21 | 10,8 ± 7,1 |
| Gruppe III Positive Heparin/PF4- Antikörper ohne HIT | 24 | 64 ± 12 | 20/4 | 238 ± 78 | 246 ± 78 | 12,7 ± 3,8 |
| Gruppe IV Thrombo- zytopenie ohne HIT | 20 | 60 ± 12 | 10/10 | 221 ± 127 | 70 ± 19 | 30,3 ± 19,9 |

Tab. 3.1.: Klinische Charakteristika der Patientengruppen (MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung)

4. Methoden

4.1 Gewinnung der Plasmen (Präanalytik)

4.1.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte nach vorheriger Staunung durch venöse Punktion in der Regel aus der Cubitalvene am liegenden bzw. ruhenden Patienten. Punktiert wurde mit gebräuchlichen Kanülen (21 und 20 G) mit passendem Anschlußstück für Monovetten.

Das Vollbut wurde in Citrat-antikoagulierte Monovetten der Firma Sarstedt mit einem Mischungsverhältnis 10 : 1 [Vollblut : Citrat] entnommen.

4.1.2 Zentrifugation und Lagerung

Nach Entnahme und Transport wurde das Citratblut innerhalb von 2 – 3 Stunden verarbeitet. Durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 2000 g wurde Citratplasma erzeugt, in Eppendorf-Cups zu je 500 µl portioniert und bei -70°C tiefgefroren.

4.1.3 Reagenzien und Geräte

S-Monovette, Citrat-antikoaguliert [10 : 1] (Firma Sarstedt, Nümbrecht)

Monovette-Kanüle, 20 und 21 G (Firma Sarstedt, Nümbrecht)

Zentrifuge: *Rotanta/S* (Firma Hettich, Tuttlingen)

4.2 Heparin/PF4 Enzyme-linked immunosorbent Assay (HPF4-ELISA)

4.2.1 Testprinzip

Dieser von Amiral et al. (1992) entwickelte Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) ist kommerziell erhältlich und weist Antikörper gegen Heparin/Plättchenfaktor 4 (PF4)-Komplex im Plasma nach.

Die verwendete Mikrotiterplatte ist mit einem Komplex aus hochgereinigtem Plättchenfaktor 4 und unfraktioniertem Heparin in einem stöchiometrisch optimal definierten Verhältnis (27 I.E. Heparin pro 1 mg Plättchenfaktor 4) beschichtet.

Dieser Komplex ist identisch mit dem Antigen, das bei Patienten mit Heparin-induzierter Thrombozytopenie Typ II eine Immunreaktion auslöst.

Die zu testenden Plasmaproben werden verdünnt auf die Mikrotiterplatten inkubiert. Befinden sich Antikörper gegen Heparin/PF4-Komplex in der Patientenprobe, binden sich diese während der Inkubationsphase fest genug an das auf der Festphase der Mikrotiterplatte präsentierte Antigen, so daß sich die übrigen Plasmabestandteile durch intensives Spülen eliminieren lassen.

Im folgenden Schritt werden Autoimmunglobuline, d.h. Ziegenantikörper gegen humane Immunglobuline der Klassen IgG, IgM und IgA auf die Festphase geschichtet. Falls Heparin/PF4-Antikörper an der Festphase absorbiert sind, werden diese vollständig von den im Überschuß zugegebenen Ziegenimmunglobulinen besetzt.

Die antihumanen Ziegenimmunglobuline sind mit einer Peroxidase, einem Enzym, das die Umsetzung eines Substrates katalysiert, konjugiert.

Der Antikörpernachweis erfolgt nun indirekt durch die katalytische Umsetzung der Substrate ortho-Phenylendiamin und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), deren Reaktionsprodukte eine Färbung der Reaktionslösung verursachen. Die Verfärbungsintensität in einem definierten Reaktionszeitraum ist mittels photometrischer Absorptionsmessung bei einer bestimmten Wellenlänge quantitativ bestimmbar und korreliert relativ gut mit der an der Festphase gebundenen und damit im Plasma vorhandenen Antikörpermenge.

Zur isolierten Bestimmung der Immunglobulinklassen IgG, IgM oder IgA wurde die gegen alle Klassen gerichtete Autoimmunglobulinmischung ausgetauscht gegen Autoimmunglobulinlösungen, die gegen die jeweiligen Immunglobulinklassen gerichtet sind.

4.2.2 Reagenzien und Geräte

1. Der Heparin/PF4-Antikörper ELISA Testkit, *Asserachrom HPIA* (Serbio Research Laboratories, Gennevilliers, Frankreich)

Chargennummern: 6304 A 10, 6318 A 11, 7114 B 17, 7119 C 18

enthält folgende Reagenzien:

- a) 12 Streifen (Strips) mit jeweils 8 Mikrotitervertiefungen (Wells) in Reihe, beschichtet mit kovalent gebundenen Heparin/PF4-Komplexen in definiertem Verhältnis
 - b) 6 Flaschen mit Mischung aus Ziegenautoimmunglobulin gegen humanes IgG, IgM und IgA, Peroxidase-konjugiert und gefriergetrocknet
 - c) 6 Tabletten á 2 mg ortho-Phenylendiamin (1,2-Diaminobenzol= $C_6H_4(NH_2)_2$)
 - d) 1 Flasche gebrauchsfertiger mit Ziegenserum versetzter Dilutionspuffer (100 ml)
 - e) 1 Flasche Waschlösungskonzentrat (50 ml)
 - f) 6 Tabletten á 5 mg Harnstoffperoxid als Wasserstoffperoxidonator
 - g) 3 Flaschen lyophilisierte HPIA Negativkontrolle
 - h) 3 Flaschen lyophilisierte HPIA Positivkontrolle
2. Flaschen mit Ziegenautoimmunglobulin gegen jeweils humanes IgG, IgM oder IgA, Peroxidase- konjugiert und gefriergetrocknet (Serbio Research Laboratories, Gennevilliers, Frankreich)
- Chargennummern: IgG: 6123 A 05, 7154 A 1R IgM: 6123 B 05, 7154 A 1R IgA: 6130 A 04
3. Mikrotiterplattenwaschautomat: *Washer 200 Mikrowellsystem* (Organon Teknika, Turnhout, Belgien)
4. Mikrotiterplattenphotometer: *SLT Spectra Reader* (TECAM GmbH, Crailheim)
5. Probenmischgerät
6. Pipetten: a. *Varipipette* 1 - 10 μ l, 100 - 1000 μ l (Eppendorf, Köln)
b. *Multipipette* 50 - 250 μ l (Eppendorf, Köln)
7. Pipettenspitzen (Greiner Labortechnik, Frankfurt)
8. 3molare Schwefelsäure

4.2.3 Testvorbereitung

Nach etwa 30-minütigem Auftauen bei Raumtemperatur oder 15 min im 37°C Wasserbad wird 1 µl des Plasmas nach sorgfältigem Mischen der Probe in 100 µl Dilutionspuffer (D) suspendiert (entspricht einer Verdünnung von 1:101). Negativ-(G) und Positivkontrolle (H) werden ebenfalls in 1 ml Dilutionspuffer, antihumane Immunkonjugate (D) in 4 ml Dilutionspuffer möglichst unmittelbar vor Gebrauch gelöst. Bei der isolierten Immunglobulinklassenbestimmung erfolgt die Lösung der Immunkonjugate in 3 ml anstatt 4 ml Dilutionspuffer. Von dem Harnstoff und dem ortho-Phenylendiamin werden jeweils 2 mg (entspricht einer Tablette) in 4 ml Aqua destillata gegeben. Diese Menge ist ausreichend für zwei Mikrotiterstreifen (Strips), d.h. 8 Doppelbestimmungen.

Waschlösung wird durch Verdünnung des Konzentrates (E) mit destilliertem Wasser um das 20-fache hergestellt und in die Waschgerätekübel gefüllt.

4.2.4 Testdurchführung

| | | | | | | | | |
|---------|----------|---------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Strip 1 | Leerwert | Pos. Kontr. 1 | neg. Kontr. 1 | Patient 1 | Patient 2 | Patient 3 | Patient 4 | Patient 5 |
| Strip 2 | Leerwert | Pos. Kontr. 2 | neg. Kontr. 2 | Patient 1 | Patient 2 | Patient 3 | Patient 4 | Patient 5 |

Tab.4.1: Pipettierschema für zwei Strips. Die Absorbtionswerte werden als Doppelbestimmungen ermittelt. Plattenvertiefungen 1 bis 3 für Leerwert, Positiv- und Negativkontrolle, 4 bis 8 für Patientenplasmen.

Die Durchführung erfolgt möglichst bei 20°C Raumtemperatur. Probenverdünnungen, Positiv- und Negativkontrolle und Dilutionspuffer als Leerwert werden in Doppelbestimmungen von jeweils 200 µl nach dem Schema in Tab. 4.1. in die Vertiefungen zweier nebeneinander liegender Mikrotiterstreifen pipettiert und inkubieren für eine Stunde.

Die Überstände werden verworfen und alle Vertiefungen mit dem Waschautomaten jeweils fünfmal ausgespült. Dann werden jeweils 200 µl des Immunkonjugates pipettiert und für eine Stunde inkubiert. Zur gleichzeitigen Bestimmung der Klassen IgG, IgM und IgA wird die Immunkonjugatmischung verwandt, für die separate Bestimmung werden die Immunkonjugate der einzelnen Immunglobulinklassen eingesetzt. Nach dem Verwerfen erfolgt erneut

ein fünfmaliges Waschen der Mikrotitervertiefungen. Im Anschluß werden jeweils 200 µl der OPD/ Harnstoff-Substratlösung zum Inkubieren in die Wells pipettiert. Nach einem genau einzuhaltenden Zeitintervall von 5 min wird die enzymatische Umsetzungsreaktion der Substrate durch Zugabe von 50 µl 3 molarer Schwefelsäure gestoppt. Nach etwa 10 min hat sich die verfärbte Lösung homogenisiert, und die Absorbtionen der Mikrotiterwells können innerhalb von 2 Stunden im Mikrotiterlesegerät bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen werden.

Aus den beiden Einzelwerten jeder Doppelbestimmung wird der Durchschnittswert errechnet. Die Testergebnisse sind nur auswertbar, wenn bei einer Temperatur von etwa 20°C die Positivkontrolle einen Wert von ≥ 1.2 und die Negativkontrolle einen Wert von ≤ 0.25 aufweisen. Der Cut-Off ist definiert mit 0.5 bei der Messung der IgG, IgM und IgA Immunglobulinmischung und 0.2 bei der Bestimmung der einzelnen Immunglobulinklassen. Er errechnet sich aus dem Durchschnittswert von 63 Normalplasmen durch Addition von drei Standardabweichungen (Amiral et. al 1992). Ergebnisse, die größer als die definierten Cut-Offs sind, werden als positiv gewertet, d.h. Heparin/PF4-Antikörper sind nachweisbar.

4.3 Heparin-induzierter Plättchen-Aktivierungstest (HIPA-Test)

4.3.1 Testprinzip

Der HIPA Test wurde von Greinacher et al. 1991 entwickelt. Grundlage dieses Testes ist die optisch sichtbare, aktivierungsabhängige Aggregation von Spenderthrombozyten in Gegenwart von Heparin und Serum von Patienten mit Heparin-induzierter Thrombozytopenie. Untersucht wird die Aktivierung der Thrombozyten bei zwei verschiedenen Heparinkonzentrationen: 0,2 IE/ml und 100 IE/ml.

Eine Thrombozytenaktivierung durch ein Serum mit HIT Typ II-Antikörpern findet nur bei der niedrigen Konzentration statt, weil sich bei dieser Konzentration die multimolekularen Heparin/PF4-Komplexe ausbilden, an die der Antikörper bindet. Bei der höheren Konzentration geschieht dies bedingt durch den Überschuß an Heparin nicht. Dem Testprinzip liegt die Theorie zugrunde, daß die Thrombozyten durch Bindung des Heparin/PF4 Antigen-Antikörper-Komplexes an ihren Fc-Rezeptor aktiviert werden. Jedoch ist der Test nicht nur

spezifisch für Heparin/PF4-Antikörper, sondern erfaßt auch andere Antikörper, die zu einer Plättchenaktivierung führen können.

Desweiteren besteht die Möglichkeit, Kreuzreaktivitäten mit alternativen Antikoagulantien wie z.B. *Orgaran*® auszutesten.

4.3.2 Reagenzien und Geräte

1. ACD-A, *Biostabil*, 500 ml (Biotest Pharma GmbH, Dreieich)
2. *Apyrase*: ATPase, ADPase, 2000 ATU, 1000 U/ml NaCl 0,9%ig: # A7646 (Sigma, München)
3. Hirudin 2000 ATU, 1000 U/ml NaCl 0,9%ig (Pentapharm Ltd., Basel, Schweiz)
4. 10%ige Glucoselösung, *Glucosteril* (Fresenius, Bad Homburg)
5. Rinderalbumin 20%ig: aus 0,4 g Rinderalbumin + 2ml PBS
Albumin aus Rinderserum rein: # 11930 (Serva Biochemica, Heidelberg)
PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} : # 042-04200 M (Gibco Ltd., Schottland)
6. Heparin-Calcium: *Calciparin* (Sanofi-Synthelabo, Berlin)
7. Kollagen und Horms Puffer (Hormon Chemie, München)
(40 µg/ml), entspricht einer Endkonzentration von (4 µg/ml)
8. Stahlkugeln, (SKF, Schweinfurt)
9. Mikrotiterplatten, Nr. 650160 (Greiner Labortechnik, Frankfurt)
10. Magnetrührer

4.3.3 Testvorbereitung

1. Ansetzen der Thrombozytenwaschlösungen: Tyrodepuffer 1 und 2
 - A. **Lösung A:** 160g Natriumchlorid, 4g Kaliumchlorid, 1g Natriumdihydrogenphosphat
Dihydrat, 20 g Natriumhydrogencarbonat in 1000 ml Aqua purificata
 - B. **Tyrodepuffer 1:** 5 ml Lösung A, 1,75 ml Rinderalbumin 20%ig, 1 ml Glucosteril 10%ig, 0,05 ml Hirudin 1000 IE/ml, 0,1 ml Apyrase 1000 IE/ml in 100 ml Aquadestillata
 - C. **Tyrodepuffer 2:** wie Tyrodepuffer 1, jedoch ohne Apyrase und Hirudin und mit 0,003 Mol CaCl_2 und 0,001 Mol MgCl_2

2. Gewinnung und Waschen der Spenderthrombozyten:

Aus antikoaguliertem Venenblut (1,6 Teile ACD-A + 8,4 Teile Blut) von gesunden Spendern wird durch Zentrifugieren (120 g / 30 min) plättchenreiches Plasma (PRP) gewonnen und mit 111 μ l ACD-A/ 1 ml PRP angesäuert. Durch die Ansäuerung wird die vorzeitige Plättchenaktivierung vermindert. Anschließend erfolgt eine erneute Zentrifugation bei 800 g für 7 min. Der Überstand wird verworfen, das Plättchenpellet in dem Tyrodepuffer 1 resuspendiert und 15 min bei 37°C inkubiert.

Nach erneutem Abzentrifugieren mit 800 g für 7 min und Verwerfen des Überstandes erfolgt die Resuspension des gewonnenen Pellets in Tyrodepuffer 2. Nach Ermittlung der Thrombozytenzahl im Coulterzählgerät erfolgt die Einstellung der Suspension auf etwa $300 \times 10^3/\mu$ l und eine anschließende 30-minütige Ruhephase.

4.3.4 Testdurchführung

Der Testansatz besteht aus 75 μ l Thrombozytensuspension, 20 μ l der hitzeinaktivierten Patientenprobe und 10 μ l des jeweils auszutestenden Reagenzes: Als Testreagenzien werden Suspensionspuffer, Liquemin in den Konzentrationen (in Klammern Endkonzentrationen wie im PRP) 2,1 IE/ml (0,2 IE/ml) und 1050 IE/ml (100 IE/ml), Orgaran 2,1 IE/ml (0,2 IE/ml), Kollagen 400 μ g/ml (40 μ g/ml) eingesetzt.

Der komplette Ansatz wird in einer mit zwei Stahlkügelchen beschickten Vertiefung einer Mikrotiterplatte 45 min bei Raumtemperatur unter Rühren (500 Upm) auf einem Magnetrührer inkubiert. Das Ergebnis wird optisch im Durchlicht von zwei unterschiedlichen Untersuchern abgelesen. Die Proben werden jeweils mit Thrombozyten von mindestens 3 Spendern getestet, so daß ein Mikrotiterplattenbelegungsschema wie in Tab. 4.2. (siehe S. 37) eingehalten wird.

| | Suspensions- Puffer | Liquemin 0,2 U/ml | Liquemin 100 U/ml | Orgaran 0,2 U/ml | Kollagen 40 ug/ml |
|-----------|------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| Spender 1 | trüb | klar | trüb | klar | klar |
| Spender 2 | trüb | klar | trüb | klar | klar |
| Spender 3 | trüb | klar | trüb | klar | klar |
| Spender 4 | trüb | klar | trüb | klar | klar |

Tab. 4.2.: Testansatz auf Mikrotiterplatte für ein Plasma mit Thrombozyten von 3 bis 4 Spendern, Suspensionspuffer als Negativkontrolle, Heparin in niedriger und hoher Konzentration, Orgaran zur Kreuzreaktivitätstestung und Kollagen als Indikator für Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten. Beurteilung des dargestellten Ergebnisses: positives Testergebnis für Heparin-induzierte Antikörper, positive in-vitro-Kreuzreaktivität mit Orgaran.

4.3.5 Testauswertung

Beurteilungskriterium ist, ob die Thrombozytensuspension in einem Testansatz trüb bleibt oder aufklart, was Folge der Plättchenaktivierung und -aggregation ist und als positives Testergebnis gewertet wird. Die Diagnose HIT Typ II wird dann als gesichert angesehen, wenn die Plättchen von mindestens 3 von 4 Spendern in den Testansätzen mit niedriger Heparinkonzentration, nicht aber in den mit der hohen Konzentration aktiviert werden (siehe Tab. 4.2.). Voraussetzung für die Beurteilbarkeit ist ein positives Ergebnis in allen Ansätzen mit Kollagen als Kontrolle der Aktivierbarkeit der Spenderthrombozyten und zum optischen Vergleich mit den anderen Ergebnissen.

Alle HIPA-Testungen wurden im Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt, wo dieser Test entwickelt wurde und zur Routinediagnostik eingesetzt wird.

4.4 Statistische Methoden

Die statistischen Berechnungen wurden mit den Statistikprogrammen SPSS Version 9.0 und BIAS Version 7, einem von dem Zentrum der Biomathematik der Universitätsklinik Frankfurt am Main entwickelten Programm, durchgeführt.

1. Zuerst wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test (H-Test), ein nicht-parametrischer Test für mehr als zwei unabhängige Stichproben, geprüft, ob die untersuchten Stichproben, die

Gruppen I, II, III und IV, bezüglich der untersuchten Parameter Immunglobulin IgG, IgM, IgA oder HIPA-Test derselben Grundgesamtheit angehören, oder ob anhand dieser Parameter eine signifikante Unterscheidung der Stichproben erzielt werden kann.

2. Hierauf aufbauend erfolgte eine differenziertere Signifikanzuntersuchung mit dem Dunn-Test. Im Dunn-Test werden jeweils zwei Gruppen im paarweisen Vergleich auf einen signifikanten Unterschied für einen bestimmten Parameter untersucht.
3. Mit der univariaten Diskriminanzanalyse wird ein prädiktives Modell für Gruppenzugehörigkeiten von Individuen nach bestimmten Kriterien errechnet: d.h. anhand der ermittelten Laborwerte kann die Aussage getroffen werden, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Patient einem der Kollektive zuzuordnen ist.

In der univariaten Diskriminanzanalyse wird die Fehlklassifikationsrate ermittelt, die angibt, wie groß der Anteil der Individuen ist, die anhand eines Kriteriums richtig bzw. falsch in ihre ursprüngliche Gruppe klassifiziert werden. Die minimale Fehlklassifikationsrate geht von gleichen a priori Wahrscheinlichkeiten für die untersuchten Gruppen aus.

Das Kriterium mit der vergleichsweise niedrigsten Fehlklassifikationsrate bietet die beste Trennschärfe zwischen zwei Stichproben bzw. Patientengruppen.

5. Ergebnisse

5.1 Grunderkrankungen und Klinik der HIT Typ II Patienten

Tabelle 5.1. (S. 40) zeigt, dass sich in dem unselektierten HIT-Patientenkollektiv am häufigsten (49 %) Patienten fanden, die einer orthopädischen oder traumatologischen Operation unterzogen wurden.

Patienten mit Herz- und Gefäßerkrankungen lagen, chirurgisch behandelt, an zweiter Stelle (15 %), internistisch therapierte Gefäßpatienten an dritter Stelle (11 %).

Alle anderen chirurgischen Eingriffe zusammen kamen deutlich seltener vor (7 %).

Bei Patienten mit orthopädisch-traumatologischen Eingriffen manifestierte sich eine HIT Typ II am häufigsten (46 %) durch Thrombozytopenie mit isolierten venösen Thrombosen und am seltensten (13 %) durch isolierte arterielle Thrombosen.

Bei Patienten mit Herz- und Gefäßerkrankungen waren, unabhängig davon ob konservativ oder chirurgisch behandelt wurde, häufiger Thrombozytopenien mit oder ohne arterielle thromboembolische Komplikationen zu finden (siehe Tab. 5.1., S. 40).

Insgesamt traten die Manifestationsformen isolierte Thrombozytopenie (29 %), isolierte arterielle (24 %) oder venösen (31 %) Thrombosen etwa gleich häufig auf. Nur das kombinierte Ereignis aus venösen und arteriellen thromboembolischen Komplikationen war etwas seltener (16 %).

| | Orthopäd./ traumatologische Patienten | Herz- u. Gefäßchirurgische Patienten | andere chirurgische Patienten | Herz-/ Gefäßkrank- heiten konservativ | Andere Kranken- heiten konservativ | gesamt |
|---------------------------------------|---|--|-------------------------------------|---|--|----------------|
| Isolierte Thrombopenie | 5 (23) | 3 (43) | 1 (33) | 2 (25) | 2 (40) | 13 (29) |
| venöse Thrombose | 10 (46) | 1 (14) | 1 (33) | 1 (12,5) | 1 (20) | 14 (31) |
| Arterielle Thrombose | 3 (13) | 3 (43) | 0 | 1 (20) | 1 (20) | 11 (24) |
| Arterielle und venöse Thrombose | 4 (18) | 0 | 1 (33) | 1 (20) | 1 (20) | 7 (16) |
| gesamt | 22 (49) | 7 (15) | 3 (7) | 5 (11) | 5 (11) | 45 |

Tab. 5.1.: Gegenüberstellung der Grunderkrankung bzw. Ursache für die Heparintherapie und der Art der klinischen Manifestation der 45 HIT-Patienten. Angabe als Absolutwert, in Klammern ist der prozentuale Anteil angegeben. In der Gruppe mit anderen chirurgischen Patienten wurden zwei Hysterektomien und eine Strumektomie zusammengefasst. Internistische Patienten mit Herz- und Gefäß-erkrankungen wurden mit percutaner transluminaler Angioplastie (PTA) bzw. Koronarangioplastie (PTCA) oder mit thrombolytischer Therapie bei Myokardinfarkt behandelt. Zu den anderen konservativ behandelten Grunderkrankungen, die nicht direkt vaskulär waren, zählten Niereninsuffizienz mit chronischer Hämodialyse, Traumata mit Prellungen und kardiale Tachykardien bzw. Arrhythmien.

5.2 Heparin/PF4-EIA Testergebnisse

| | I (n = 32) | II (n = 13) | III (n = 24) | IV (n = 20) |
|-------------|---------------|----------------|-----------------|----------------|
| IgG | 34,4 (11) | 30,8 (4) | 25 (6) | 0 (0) |
| IgM | 9,4 (3) | 0 (0) | 12,5 (3) | 15 (3) |
| IgA | 0 (0) | 0 (0) | 29,2 (7) | 0 (0) |
| IgG + IgM | 25 (8) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| IgG + IgA | 25 (8) | 30,8 (4) | 4,2 (1) | 0 (0) |
| IgM + IgA | 3,1 (1) | 0 (0) | 12,5 (3) | 0 (0) |
| IgG,IgM,IgA | 3,1 (1) | 38,5 (5) | 8,3 (2) | 0 (0) |

Tab. 5.2.: Prozentualer Anteil (in Klammern absolute Zahlen) der positiven Ergebnisse der einzelnen Immunglobulinklassen IgG, IgM und IgA bzw. deren Kombinationen für die Gruppen I (= HIT-Patienten mit thromboembolischen Komplikationen), II (= HIT- Patienten mit isolierter Thrombozytopenie), III (= gefäßchirurgische Patienten mit Heparin/PF4-Antikörpern ohne HIT-typische Symptomatik) und IV (= Patienten mit Thrombozytopenie während Heparintherapie mit anderer Ätiologie). Ergebnisse waren positiv bei einer Absorption > 0,2 (A492nm).

Wie Tabelle 5.2. zeigt, ließ sich die Immunglobulinklasse IgG mit 100 % am häufigsten in Gruppe II, den HIT-Patienten mit isolierter Thrombozytopenie, nachweisen.

In Gruppe I, den HIT-Patienten mit thrombembolischen Komplikationen, betrug der Anteil dieser Klasse insgesamt 87,5 % (28/32) der Fälle. Hingegen in Gruppe III, den gefäßchirurgischen Patienten mit Heparin/PF4-Antikörpern ohne HIT-typische Symptomatik, traten sie in nur 37,5 % (9/24) der Fälle und gar nicht in Gruppe IV, der Patienten mit Thrombozytopenie mit anderer Ursache, während Heparintherapie auf.

IgG konnte isoliert nachgewiesen werden in Gruppe I in 34,4 % (11/32) der Fälle, in Gruppe II in 30,8 % (4/13) und in Gruppe III in 25 % (6/11) der Fälle.

Immunglobulin M war insgesamt am häufigsten in Gruppe I mit 40,6 % (13/32), gefolgt von Gruppe II mit 38,5 % (5/13), Gruppe III mit 33 % (8/24) und Gruppe IV mit 15 % (3/20).

In Gruppe IV war IgM die einzige nachweisbare Immunglobulinklasse, d.h. bei den drei betroffenen Patienten war diese Klasse ausschließlich isoliert nachweisbar.

In Gruppe I fand sich IgM isoliert in 9,4 % (3/32), in Gruppe II gar nicht und in Gruppe III in 12,5 % (3/24) der Fälle.

Immunglobulinklasse IgA war in Gruppe III in 54,2 % (12/24) der Fälle, in 37,5 % (9/24) bei Gruppe II, in 34,4 % (11/32) in Gruppe I nachweisbar.

Isoliert konnte IgA bei keiner der beiden Gruppen mit HIT-Patienten (I und II) gefunden werden, jedoch in der Gruppe III kam sie auch in 29,2 % (7/24) ohne Kombination mit einer der anderen Klassen vor.

Der statistischen Analyse der Absorptionswerte der Heparin/PF4-Immunglobulinklassen und der Ergebnisse des Heparin-induzierten Plättchenaktivierungstests (HIPA) vorangestellt wurde die Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests, der unter gleichzeitiger Einbeziehung aller untersuchten Gruppen I bis IV entscheidet, ob die Immunglobulinklassen bzw. Testmethoden zwischen den Gruppen signifikant unterscheiden können.

Für alle Parameter, d.h. für die Immunglobulinmischung, die Immunglobulinklassen IgG, IgM und IgA und den HIPA-Test fanden sich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), so daß eine differenziertere statistische Analyse mit dem Dunn-Test, bei dem die Gruppen I bis IV immer paarweise gegeneinander verglichen werden, und die Durchführung einer Diskriminanzanalyse gerechtfertigt waren.

5.3 Absorptionswerte der Heparin/PF4- Immunglobulinmischung aus IgG, IgM und IgA

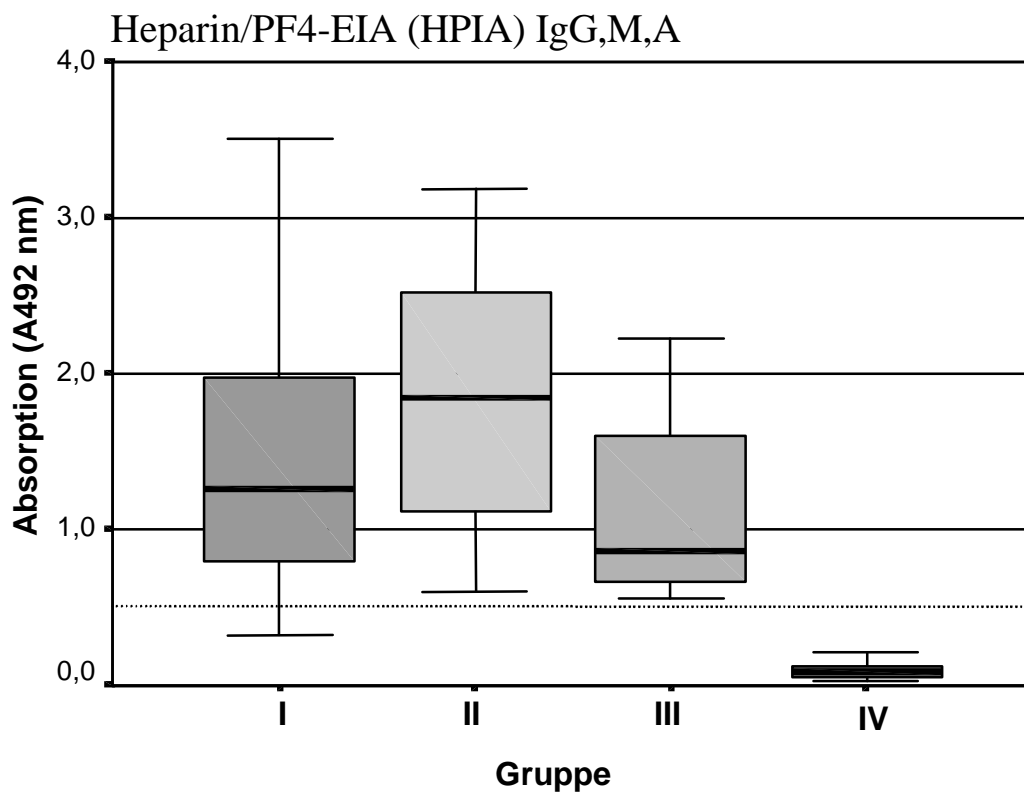


Abb. 5.1.: Absolute Absorptionswerte (A 492 nm) der Gruppen I (HIT-Patienten mit thromboembolischen Komplikationen), II (HIT-Patienten mit isolierter Thrombozytopenie), III (gefäßchirurgische Patienten mit Heparin/PF4-Antikörpern ohne HIT-typische Symptomatik) und IV (Patienten mit Thrombozytopenien mit anderer Ursache) für die Immunglobulinklassenmischung (IgG,IgM,IgA) als Boxplots mit Median, oberer und unterer Quartile und 10. und 90. Perzentile. Im paarweisen Gruppenvergleich nach Dunn keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen I,II und III. Gepunktete Linie ist der Cut-Off (0,5).

In Abbildung 5.1. (S. 43) sind die Absolutwerte der Absorptionen der Mischung aus den Heparin/PF4-Immunglobulinen IgG, IgM und IgA dargestellt:

Die Gruppe II mit den HIT-Patienten ohne thromboembolische Komplikationen hatte den höchsten Median von allen (1,84), gefolgt von der Gruppe I mit den HIT-Patienten mit venösen und arteriellen thromboembolischen Komplikationen (1,26) und der Gruppe III, den gefäßchirurgischen Patienten mit isoliertem Heparin/PF4-Antikörpernachweis ohne HIT-typische Symptomatik wie Thrombozytopenie oder thromboembolische Komplikationen (0,86).

Für die Gruppe IV, den Patienten mit einer Thrombozytopenie anderer Ursache während der Heparintherapie, lag der Median mit 0,05 deutlich unter dem der anderen Gruppen.

Im paarweisen Vergleich nach Dunn zeigte sich für die Mischung der Immunglobulinklassen kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zwischen den beiden Gruppen mit HIT-Patienten mit und ohne thromboembolische Komplikationen (I und II).

Auch Gruppe III (asymptomatische Patienten mit Heparin/PF4-Antikörpern) unterschied sich hinsichtlich der Absorptionswerte der Mischung nicht signifikant ($p > 0,05$) von den beiden HIT-Patientengruppen (I und II), jedoch bestand im Vergleich der Gruppe III und II eine Tendenz zur Signifikanz ($p = 0,077$).

Aufgrund des Einschlußkriteriums "negatives HPIA-Testergebnis" unterschied sich Gruppe IV erwartungsgemäß von allen anderen Gruppe hochsignifikant ($p > 0,001$) im Dunn Test.

5.4 Absorptionswerte der Heparin/PF4- Immunglobulin- klasse IgG

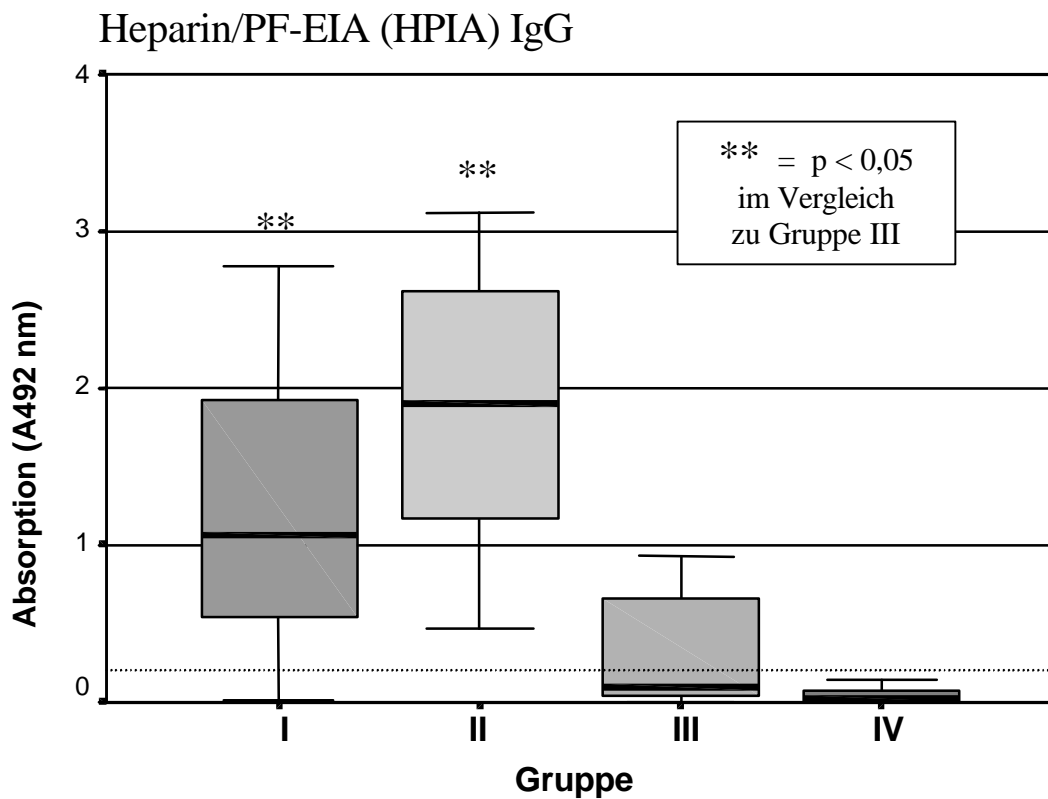


Abb. 5.2.: Absolute Absorptionswerte (A492nm) der Immunglobulinklasse IgG für die Gruppen I (HIT-Patienten mit thromboembolischen Komplikationen), II (HIT-Patienten mit isolierter Thrombozytopenie), III (gefäßchirurgische Patienten mit Heparin/PF4-Antikörpern ohne HIT-typische Symptomatik) und IV (Patienten mit Thrombozytopenie während anderer Ursache) als Boxplots mit Medianen, unteren und oberen Quartilen und der 10. und 90. Perzentile. Im paarweisen Gruppenvergleich nach Dunn signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen I und III bzw. II und III. Gepunktete Linie kennzeichnet den Cut-Off für IgG (0,2).

In Abbildung 5.2. (S. 45) ist zu sehen, daß die Gruppe II mit 1,9 den höchsten Median auch für die Absorptionen der Immunglobulinklasse IgG hatte, gefolgt von Gruppe I (1,06). Der Median der Gruppe III lag mit 0,095 deutlich niedriger als die der Gruppen I und II (HIT-Patienten) unter dem vorgegebenen Cut-Off von 0,2.

Der paarweise Gruppenvergleich nach Dunn für die Absorptionen der Immunglobulinklasse IgG zeigte im Gegensatz zu der Immunglobulinmischung aus IgG, IgM und IgA einen signifikanten ($p < 0,05$) Unterschied der beiden Gruppen I und II im Vergleich zur Gruppe III.

Die Gruppe II unterschied sich sogar hochsignifikant ($p < 0,001$) von der Gruppe III.

Zwischen den Gruppen I und II (Vergleich der HIT-Patienten mit und ohne thromboembolische Komplikationen) ließ sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,10$) feststellen.

Die Gruppe IV unterschied sich in den Absorptionen der Immunglobulinklasse IgG von den Gruppen I und II hoch signifikant ($p < 0,001$), von der Gruppe III signifikant ($p < 0,05$).

5.5 Absorptionswerte der Heparin/PF4-Immunglobulin- klasse IgM

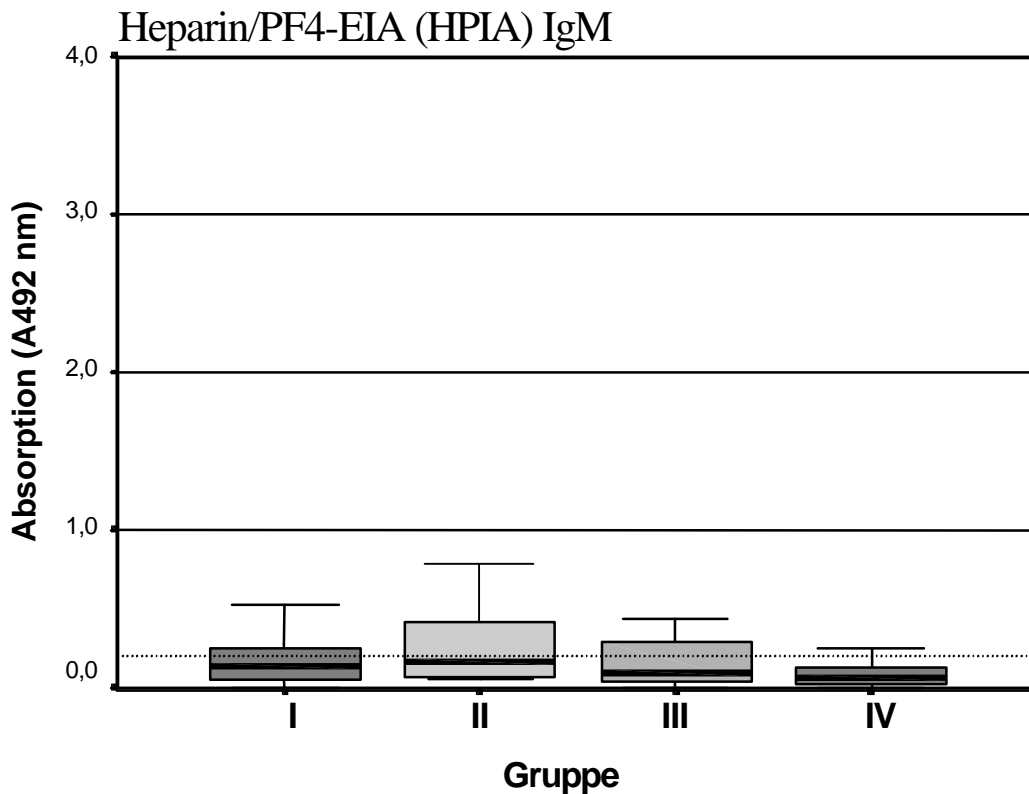


Abb. 5.3.: Absolute Absorptionswerte (A492nm) der Immunglobulin-klasse IgM für die Gruppen I (= HIT- Patienten mit thromboembolischen Komplikationen), II (= HIT- Patienten mit isolierter Thrombozytopenie), III (= gefäßchirurgische Patienten mit Heparin/PF4-Antikörpern ohne HIT-typische Symptomatik) und IV (= Patienten mit Thrombozytopenien mit anderer Ursache) als Boxplots mit Medianen, unteren und oberen Quartilen und 10. und 90. Perzentilen. Im paarweisen Gruppenvergleich nach Dunn kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$). Gepunktete Linie gibt den Cut-Off an (0,2).

Abbildung 5.3. zeigt, daß sich die Mediane der Absorptionen für die Immunglobulin-klasse IgM bei den Gruppen I bis IV nicht so deutlich wie bei der Immunglobulin-klasse IgG unterscheiden:

Die Gruppen I (0,15) und II (0,17) lagen nur geringfügig über den Gruppen III (0,09) und IV (0,06). Der Trend, den die Mediane aufzeigen, bestätigt sich in den Signifikanzberech-

nungen: Der paarweise Vergleich nach Dunn ergab zwischen Gruppen I, II und III keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,10$).

Ein Trend zur Signifikanz fand sich nur zwischen der Gruppe IV und der Gruppe I ($p = 0,091$) sowie II ($p = 0,077$), nicht jedoch zwischen Gruppe IV und III ($p > 0,05$).

5.6 Absorptionswerte der Heparin/PF4-Immunglobulin-klasse IgA

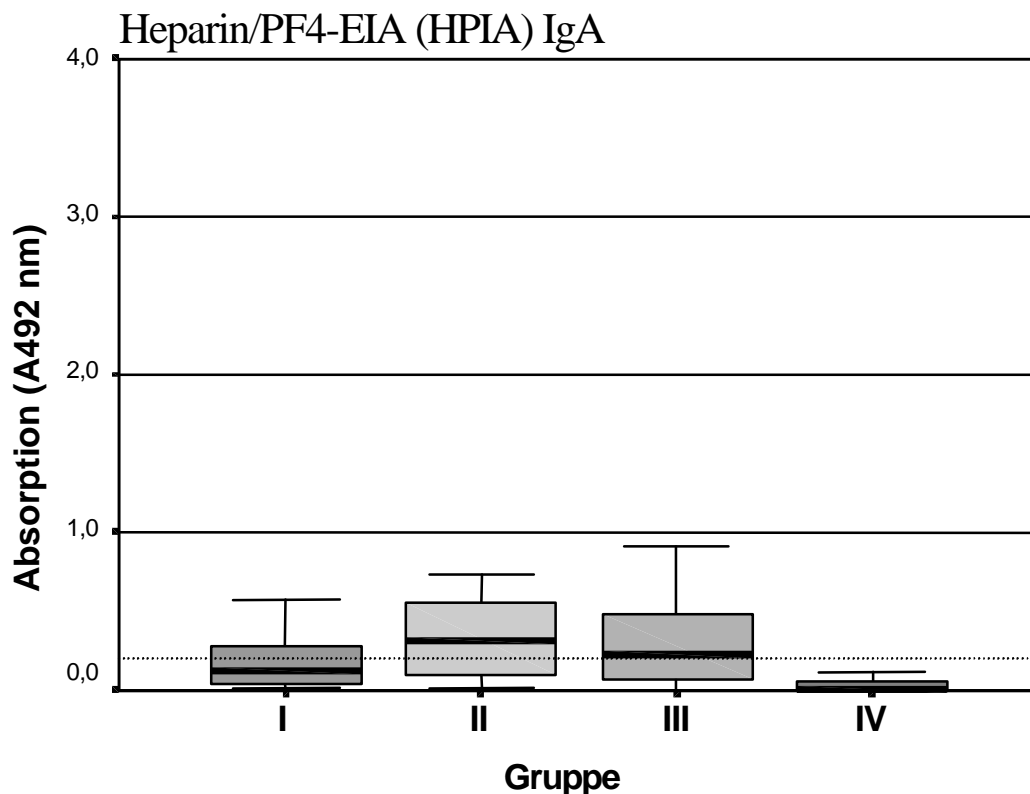


Abb. 5.4.: Absolute Absorbtionen (A492nm) der Immunglobulinklasse IgA für die Gruppen I (= HIT- Patienten mit thromboembolischen Komplikationen), II (= HIT- Patienten mit isolierter Thrombozytopenie), III (= gefäßchirurgische Patienten mit Heparin/PF4-Antikörpern ohne HIT-typische Symptomatik) und IV (= Patienten mit Thrombozytopenie während Heparintherapie mit anderer Ursache) als Boxplots mit Medianen, oberer und unterer Quartile und 10. und 20. Perzentile. Im paarweisen Gruppenvergleich nach Dunn kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zwischen den Gruppen I und II im Vergleich zur Gruppe III. Gepunktete Linie gibt den Cut-Off an (0,2).

Wie Abbildung 5.4. (S. 48) verdeutlicht, divergierten wie bei IgM auch die Mediane der Absorptionen der Immunglobulinklasse IgA aller Gruppen nur wenig:

Die Gruppe II (HIT ohne thromboembolische Komplikationen) hatte mit 0,31 den höchsten Median, gefolgt von Gruppe III (0,23), Gruppe I (0,13) und Gruppe IV (0,01).

Im paarweisen Vergleich nach Dunn fand man diesen Trend statistisch bestätigt:

Zwischen den Gruppen I, II (HIT-Patienten mit und ohne Thrombosen) und III bestand kein signifikanter Unterschied ($p > 0,01$). Gruppe IV unterschied sich von allen anderen Gruppen hochsignifikant ($p < 0,001$).

5.7 Heparin-induzierter Plättchenaktivierungstest (HIPA)

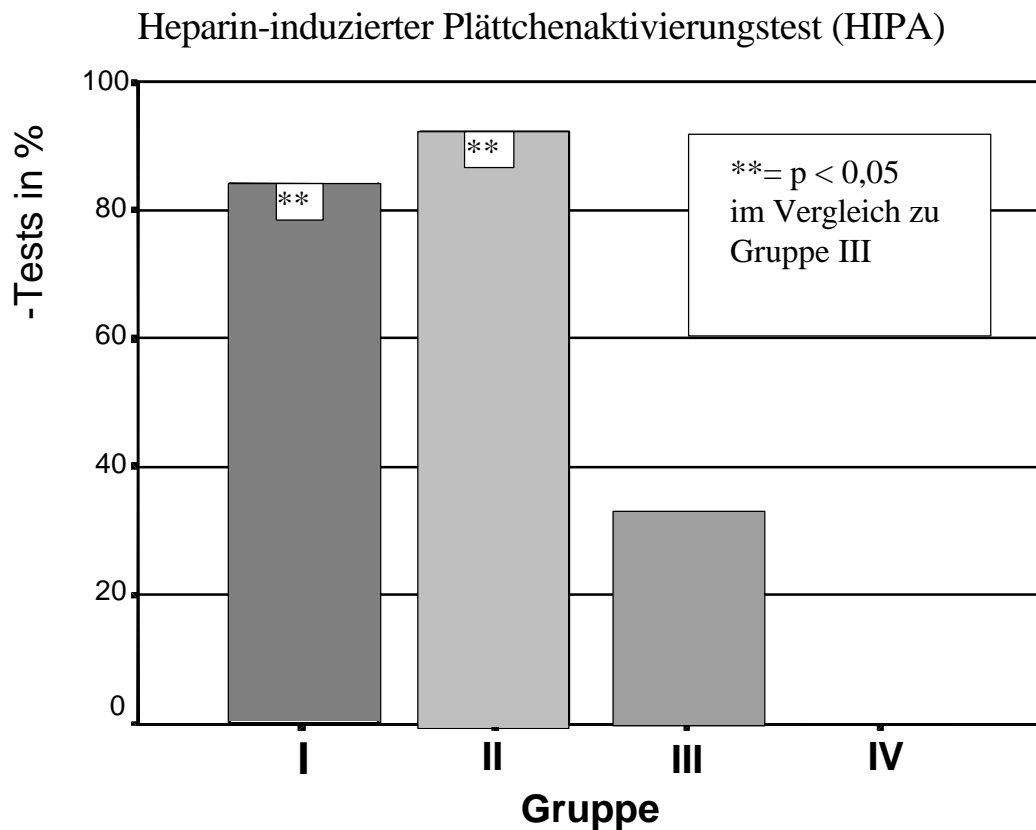


Abb. 5.5.: Relativer Anteil der positiven Testergebnisse im Heparin-induzierten Plättchenaktivierungstest (HIPA) in % für die Gruppen I (HIT-Patienten mit thromboembolischen Komplikationen), II (HIT-Patienten mit isolierter Thrombozytopenie), III (gefäßchirurgische Patienten mit Heparin/PF4-Antikörpern ohne HIT-typische Symptomatik) und IV (Patienten mit Thrombozytopenie während Heparintherapie mit anderer Ursache). Im paarweisen Gruppenvergleich im χ^2 -Test mit Yates-Korrektur signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Gruppe I,II und III.

| | I (n = 32) | II (n = 13) | III (n = 24) | IV (n = 20) |
|--------------|---------------|----------------|-----------------|----------------|
| HIPA positiv | 28 | 12 | 8 | 0 |
| HIPA negativ | 4 | 1 | 16 | 20 |

Tab. 5.3.: Darstellung der Absolutwerte der Ergebnisse des Heparin-induzierten Plättchenaktivierungstests (HIPA) für die Gruppen I, II, III und IV

Die Abbildung 5.5. (S. 50) zeigt, daß der relative Anteil der positiven Ergebnisse im Heparin-induzierten Plättchenaktivierungstest (HIPA) in den beiden HIT-Gruppen hoch war (I = 84 %, II = 92 %) und sich kaum voneinander unterschied.

Hingegen fanden sich in der Gruppe III mit den Patienten ohne klinische Symptomatik und mit positiven Heparin/PF4-Antikörpern in nur etwa einen Drittel der Fälle positive HIPA-Testergebnisse. In Gruppe IV waren keine positiven Testergebnisse nachweisbar.

Bei drei der fünf Patienten aus Gruppe I und II (alle HIT-Patienten) mit negativem HIPA-Test waren nur Heparin/PF4-Antikörper der Immunglobulinklasse IgM nicht aber der Klasse IgG nachweisbar. Die restlichen 2 Patienten hatten Antikörper aller drei Immunglobulinklassen.

Von den acht Patienten in Gruppe III mit positivem HIPA-Testergebnis hatten drei Patienten ausschließlich Immunglobuline der Klasse IgA, zwei Patienten ausschließlich IgG, ein Patient IgM, ein Patient eine Kombination von IgG und IgA und ein Patient alle drei Klassen.

Die Signifikanzberechnungen im paarweisen Vergleich mit dem χ^2 -Test zeigten für die HIT-Patienten mit Thrombose (I) signifikante ($p < 0,05$) und für die HIT Patienten ohne Thrombosen (II) hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zu den asymptomatischen Patienten mit positiven Antikörpertitern (III). Von der Gruppe IV unterschieden sich die Gruppen I, II und III hoch signifikant ($p < 0,001$).

5.8 Diskriminanzanalyse, Spezifität, Sensitivität

Der praktische Nutzen der univariaten nicht-parametrischen Diskriminanzanalyse nach Stoller (1954) liegt vor allem in der Möglichkeit, mit der minimalen Fehlklassifikationsrate eine allgemeine Prognose bezüglich der Wahrscheinlichkeit richtiger und falscher Ergebnisse zu treffen. Mit der Bestimmung der minimalen Fehlklassifikationsrate, die den kleinsten Anteil der fälschlicherweise im paarweisen Vergleich der anderen Gruppe zugeordneten Patienten angibt, erfolgt die Definition eines Trennpunktes. Dieser Trennpunkt ist so gewählt, daß der Anteil der fehlklassifizierten Patienten möglichst niedrig ist und eignet sich daher zur Optimierung eines Cut-Offs.

In der statistischen Analyse mit dem Dunn-Test zeigte sich, daß zwischen der Gruppe I und II, den HIT-Patienten mit und ohne thromboembolischen Komplikationen, kein signifikanter Unterschied besteht, und daß sich die Gruppe der asymptomatischen Patienten mit HIT-Antikörpern von den beiden ersten Gruppen unterscheiden lässt.

Deshalb bildeten wir für die Diskriminanzanalyse eine neue Gruppe (Gruppe 1), die aus allen HIT-Patienten der Gruppe I und II besteht und verglichen diese mit der Gruppe III (neue Gruppe 2) für alle Immunglobulinklassen.

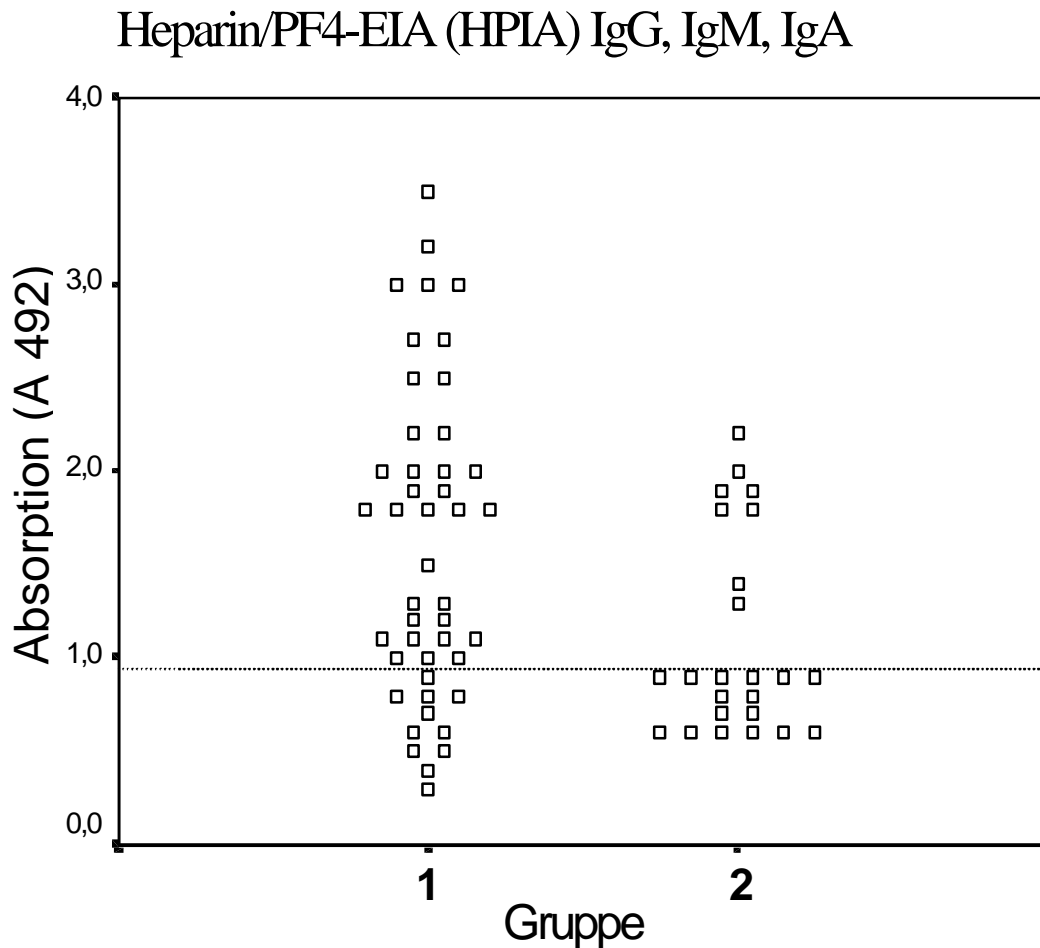


Abb. 5.6.: Absolute Absorptionswerte (A492nm) der Immunglobulinmischung aus IgG, IgM und IgA der Gruppe (1) mit allen HIT-Patienten mit und ohne thromboembolische Komplikationen und der Gruppe (2) mit asymptomatischen Patienten mit Heparin/PF4-Antikörpern im Vergleich als Streudiagramm. Gepunktete Linie gibt den Trennwert für die minimale Fehlklassifikationsrate an.

Die minimale Fehlklassifikationsrate der Immunglobulinklassenmischung aus IgG, IgM und IgA als Bezugsmaßstab liegt bei 28,9 %, d.h. mindestens 20 der 69 einbezogenen Patienten beider Gruppen werden fehlklassifiziert bzw. als falsch positiv oder falsch negativ gewertet (siehe Tab. 5.4., S. 55 bzw. Abb. 5.6., S. 53). Der Trennpunkt der minimalen Fehlklassifikationsrate ist gleichzusetzen mit einem optimierten Cut-Off, der sich von 0,5 auf 0,94 verschiebt.

| | Immunglobulinmischung | IgG | IgM | IgA |
|---|-----------------------|--------------|--------------|--------------|
| Cut Off | 0,5** | 0,2** | 0,2** | 0,2** |
| Cut-Off-MFR | 0,94 | 0,31 | 0,05 | 0,05 |
| MFR (%) | 28,9 | 20,0 | 40,0 | 38,8 |
| Anzahl fehlklassifizierter Patienten | 20/69 | 14/69 | 28/69 | 27/69 |

*Tab. 5.4.: Darstellung der minimalen Fehlklassifikationsraten (MFR), der vordefinierten (**) und der auf die minimale Fehlklassifikationsrate bezogenen Cut-Offs, sowie Angabe der fehlklassifizierten Patienten für die Immunglobulinmischung und IgG, IgM und IgA.*

Deutlich schlechter liegen die Fehlklassifikationsraten der Immunglobulinklassen IgM mit 40,0 % und IgA mit 38,8 %, die sich damit sehr nahe an der Zufallswahrscheinlichkeit befinden (Tab. 5.4., S. 55) Von den 69 Patienten werden 28 bzw. 27 Patienten der falschen Gruppe zugeordnet. Die Trennwerte von 0,05 für beide sind sehr niedrig (Tab. 5.4., S. 55).

Die niedrigste Fehlklassifikationsrate zeigte sich bei der Immunglobulinklasse IgG. Hier wurden insgesamt 20,0 % der Patienten der falschen Gruppe zugeordnet. Das entspricht 14 von 69 untersuchten Patienten. Der Trennpunkt wurde mit 0,31 geringfügig über den ursprünglich festgelegten Cut-Off von 0,20 angehoben (Tab. 5.4., S. 55 und Abb. 5.7., S. 54).

| | Antikörper- Mischung vordefinierter Cut-Off (A > 0,5) | Antikörper- Mischung MFR- Cut-Off (A > 0,94) | IgG - Antikörper vordefinierter Cut-Off (A > 0,2) | IgG - Antikörper MFR- Cut-Off (A > 0,31) | HIPA -Test |
|----------------------------|---|--|---|--|-----------------------|
| Sensitivität (%) | 91,1 | 75,6 | 91,1 | 88,9 | 86,7 |
| Spezifität (%) | 0 | 66,7 | 62,5 | 70,8 | 66,6 |

Tab. 5.5.: Sensitivität und Spezifität der Immunglobulinklassenmischung und Immunglobulinklasse IgG bei vordefinierte Cut-Offs (0,5 bzw. 0,2) und durch die minimalen Fehlklassifikationsraten (MFR) optimierte Cut-Offs (0,94 bzw. 0,31).

Der Vergleich der Abbildung 5.7. (S. 54), in der die Einzelwerte der Absorptionen für die Immunglobulinklasse IgG dargestellt sind, mit Abbildung 5.6. (S. 53) veranschaulicht, dass die Klasse IgG besser zwischen den Patienten mit HIT typischer Klinik (Gruppe 1) und den Patienten ohne Klinik mit positivem Antikörpernachweis (Gruppe 2) trennt als die Mischung.

Durch die Cut-Off Änderung für die untersuchten Immunglobulinklassen kommen auch neue Sensitivitäten und Spezifitäten zu stande:

Die Sensitivität für die Immunglobulinklassenmischung beträgt für einen Cut-Off von 0,5 91,1% und sinkt unter Berücksichtigung des Trennpunktes der minimalen Fehlklassifikationsrate von 0,94 auf 75,6 % (Tab. 5.5., S. 57). Die Spezifität, gemessen an den asymptomatischen Patienten mit Heparin/PF4-Antikörpern, kann allerdings durch die Cut-Off-Änderung deutlich von 0 % (denn alle Patienten der Gruppe III waren als Voraussetzung für die Gruppenzuordnung positiv) auf immerhin 66,7 % gesteigert werden.

Für die Immunglobulinklasse IgG ergibt sich für den Trennwert der minimalen Fehlklassifikationsrate 0,31 eine Sensitivität von 88,9 % anstatt 91,1 % bei einem Cut-Off von 0,2. Sie liegt damit deutlich höher als die der Immunglobulinmischung.

Die Spezifität beträgt 70,8 % und ist höher als die für den alten Cut-Off von 62,5 % und auch höher als die der Immunglobulinklassenmischung.

Im Vergleich zeigte der Heparin-induzierte Plättchenaktivierungstest (HIPA) (Tab. 5.5., S. 57) eine Sensitivität von 86,7 % und eine Spezifität von 66,6 %.

6. Diskussion

6.1 Einleitende Bemerkungen

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) Typ II ist eine schwerwiegende Komplikation der Heparintherapie.

Der in der Regel nach einem Intervall von 5 bis 20 Tagen nach Therapiebeginn auftretende Thrombozytenabfall bzw. das plötzliche Einsetzen innerhalb von Stunden bei Reexposition, wie es vereinzelt beschrieben wurde, deutet auf ein immunologisches Geschehen hin (Warkentin et al. 1989, Chong et al. 1989 b).

Es wurde hinlänglich bewiesen, daß sich ein Faktor aus dem Serum von HIT-Patienten isolieren läßt, der *in vitro* eine Thrombozytenaggregation auslöst und *in vivo* für die Klinik der HIT Typ II verantwortlich gemacht wird (Green et al. 1978, Cimo et al. 1979, Pfueller et al. 1986).

Bei diesem Serumfaktor handelt es sich um einen Antikörper, der gegen einen Komplex aus Plättchenfaktor 4 (PF4) und Heparin-ähnlichen Substanzen, d.h. sulfatierten Glykosaminoglykanen, gerichtet und somit nicht Heparin-spezifisch ist (Amiral et al 1992, Greinacher et al. 1993 b, Kelton et al. 1994, Visentin et al. 1994).

Der Entwicklung einer Reihe von funktionellen und immunologischen Testverfahren, die auf unterschiedliche Weise Antikörper gegen Heparin/PF4-Komplex nachweisen, folgten mehrere Studien zur Inzidenz und klinischen Relevanz dieser Antikörper bei Patienten, die mit unfraktioniertem bzw. niedermolekularem Heparin behandelt wurden (Warkentin et al. 1995, Greinacher et al. 1994 a und 1996 b, Amiral et al. 1996 b, Visentin et al. 1996, Suh et al. 1997, Lindhoff-Last et al. 2000).

Obwohl sich die Studien in der Regel bezüglich des verwendeten Tests und der Art des untersuchten Patientengutes unterschieden, machten alle übereinstimmend die Feststellung, daß in einem mit Heparin behandelten, prospektiv untersuchten Kollektiv die Inzidenz von Heparin/PF4-Antikörpern viel höher ist als die einer klinischen Manifestation der Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ II.

Warkentin et al. (1995) fanden in einer Studie mit Patienten, die Heparin zur Prophylaxe nach einer elektiven Hüftoperation erhalten hatten, bei unfraktioniertem Heparin in 7,8 % der Fälle Heparin-induzierte Antikörper im Serotoninfreisetzungstest, obwohl bei nur 2,7 % der Patienten eine für HIT typische Klinik mit positivem Testergebnis nachgewiesen werden konnte.

Sehr viel höhere Antikörperinzidenzen von 30 – 60 % ohne klinische Manifestation einer HIT Typ II sind bei offenen Herzoperationen mit einem ELISA-Test beobachtet worden (Visentin et al. 1996, Suh et al. 1997). Vergleichsweise niedrigere Inzidenzen (4,2 %) treten wohl bei chronisch hämodialysierten Patienten auf (Greinacher et al. 1996). Hier wurde mit dem Heparin-induzierten Plättchenaktivierungstest (HIPA) untersucht.

Eine prospektive Studie an gefäßchirurgischen Patienten zeigte, daß die Divergenz zwischen Testergebnis und Klinik bei einem Heparin/PF4-Antikörper-ELISA, der die Immunglobulinklassen IgG, IgM und IgA mißt, größer ist als bei einem funktionellen Test: Keiner von 50 Patienten entwickelte eine klinische Symptomatik, obwohl 34 % im Heparin/PF4-ELISA (HPIA), aber nur 14 % im Heparin-induzierten Plättchen-Aktivierungstest (HIPA) positiv waren (Lindhoff-Last et al. 2000).

Mit demselben ELISA fanden Amiral et al. (1996 b) in einem Kollektiv, das hauptsächlich wegen tiefer Beinvenenthrombose, Lungenembolie oder Herzinfarkt mit unfraktioniertem Heparin behandelt wurde, in 17 % aller Patienten Antikörper ohne Klinik.

Die je nach untersuchtem Kollektiv mehr oder weniger hohe Zahl an Patienten mit Nachweis von Heparin/PF4-Antikörpern ohne Klinik hat eine verminderte Spezifität des Tests zur Folge.

6.2 Studienziele

Das zentrale Ziel unserer Studie bestand darin, zu klären, ob durch die isolierte Messung einer der Immunglobulinklassen IgG, IgM oder IgA der Heparin/PF4-Antikörper eine bessere Unterscheidung zwischen Patienten mit einer klinisch relevanten HIT-Symptomatik und Patienten mit positivem Antikörpernachweis ohne Klinik getroffen werden kann.

Zu diesem Zweck verglichen wir eine Gruppe von prospektiv untersuchten gefäßchirurgischen Patienten, bei denen sich im Laufe einer Heparintherapie Heparin/PF4-Antikörper

gebildet hatten ohne HIT-typische Symptome, mit Patienten, die ebenfalls Antikörper hatten, zusätzlich aber die typischen Symptome einer HIT Typ II zeigten.

Aus den Erkenntnissen dieses Vergleichs sollte abgeleitet werden, ob sich die isolierte Messung einer Immunglobulinklasse in der Praxis günstiger auf die Spezifität des Heparin/PF4-ELISA auswirken kann, ohne daß es dabei zu einer geringeren Sensitivität kommt.

Ferner teilten wir das Kollektiv der Patienten, bei denen klinisch und labordiagnostisch die Diagnose HIT Typ II gesichert werden konnte, in eine Untergruppe mit isolierter Thrombozytopenie (Gruppe II) und eine mit Thrombozytopenie und thromboembolischen Komplikationen (Gruppe I) ein.

Die Intention dieser getrennten Betrachtung der HIT-Patienten bestand darin, zu klären, ob sich charakteristische Unterschiede in einer der Immunglobulinklassen IgG, IgM oder IgA aufzeigen lassen, die bezüglich der Beurteilung des Thromboserisikos eines HIT-Patienten einen prädiktiven Wert haben könnten.

Neben den bereits erwähnten schlossen wir eine vierte Gruppe als Kontrollkollektiv ein.

Die Patienten dieser Gruppe hatten ebenfalls eine Thrombozytopenie unter Heparintherapie entwickelt, jedoch war bei allen Patienten wahrscheinlich, daß die Thrombozytopenie in keinem kausalem Zusammenhang mit der Heparintherapie im Sinne einer HIT Typ II stand, da in allen Fällen ein Wiederanstieg der Thrombozyten trotz Fortsetzung der Heparintherapie folgte und andere Ursachen für die Thrombozytopenie zu finden waren.

6.3 Diskussion der klinischen Kriterien für die Gruppendefinitionen

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ II gilt als ein klinisch-pathologisches Syndrom, das nicht allein durch Labortests diagnostiziert werden kann (Warkentin et al. 1998 b). Es gibt de facto keinen labordiagnostischen Goldstandard, auch wenn der Serotonin-Release-Assay (SRA) von einigen Autoren als solcher bezeichnet wird (Sheridan et al. 1985, Greinacher et al. 1991, Eichler et al. 1999).

Um der Tatsache Rechnung zu tragen, daß die alleinige Labordiagnostik unzureichend ist, wurden in der vorliegenden Arbeit strenge klinische Kriterien für die Gruppenzuordnungen mit dem Ziel gestellt, ein hohes Maß an klinischer Wahrscheinlichkeit zu erreichen.

In die Gruppen der HIT-Patienten wurden nur "typische" Kasuistiken eingeschlossen, die an Hand ihrer klinischen Symptome dem Krankheitsbild "HIT Typ II" eindeutig zuzuordnen waren.

In Anlehnung an die aktuelle Literatur definierten wir eine Thrombozytopenie als einen relativen Abfall von mindestens 50 %, der sich auf einen prätherapeutischen Ausgangswert bezog (Warkentin et al. 1998 a).

Diese Definition berücksichtigt die individuellen Thrombozytenverläufe besser als das Heranziehen eines absoluten Grenzwertes von z.B. 100.000/ μ l als Kriterium, wie es in älteren Studien praktiziert wurde (Kelton et al. 1984, Chong et al. 1989 b und 1991, Warkentin et al. 1995).

Theoretisch wäre ein Bezugswert, der möglichst direkt vor dem Beginn des Plättchenabfalls bestimmt wurde, noch besser. Denn dieser würde nicht nur prätherapeutisch bestehende, sondern auch im Verlauf auftretende Thrombozytosen oder Thrombozytopenien anderer Genese, beispielsweise durch postoperative Hämodilution oder reaktive Thrombopoese verursacht, berücksichtigen.

In der Praxis läßt sich allerdings nicht zuletzt wegen der normalerweise relativ häufigen stärkeren Schwankungen der Plättchenzahlen ein solcher optimaler Ausgangswert nur retrospektiv klar definieren. Darüber hinaus wäre eine engmaschige, d.h. tägliche Thrombozytenkontrolle schon vor dem Abfall vorauszusetzen, was im klinischen Alltag nicht praktikabel ist.

Daher wäre eine solche Definition der Thrombozytopenie zwar optimaler, im klinischen Alltag aber kaum anwendbar.

Ein "hartes" Kriterium für die klinische Diagnose einer HIT Typ II, und damit indirekt für einen HIT Typ II beweisend, ist der Wiederanstieg der Thrombozyten auf annähernd normale Werte innerhalb von wenigen Tagen nach Beendigung der Heparintherapie (Warkentin et al. 1998 b). Alle HIT-Patienten in Gruppe I und II erfüllten dieses Kriterium.

In einigen Studien wurde nicht mitgeteilt, ob der Wiederanstieg nach Absetzen der Heparintherapie als Einschlusskriterium für die Diagnose "HIT Typ II" von entscheidender Bedeutung war (Warkentin et al. 1995, Suh et al. 1997).

Ein kritisch zu bewertender Punkt unserer Studie ist das Screening von thromboembolischen Komplikationen, die letztlich eine zentrale Bedeutung für die Zuordnung der Patienten in die Gruppen I und II haben.

Zwar wurden alle thromboembolischen Ereignisse der Patienten der Gruppe I durch ein diagnostisches, bildgebendes Verfahren gesichert. Jedoch erfolgte bei der Mehrzahl der HIT-Patienten der Gruppe II mit isolierter Thrombozytopenie der prospektive Ausschluß einer Thrombose durch die jeweiligen behandelnden Kliniken nur durch regelmäßige klinische Untersuchung des Gefäßstatus, obwohl eine bildgebende Diagnostik stets empfohlen wurde.

Hierzu ist bekannt, daß sich arterielle Thrombosen aufgrund der Symptome des einhergehenden Ischämiesyndroms in der Regel eindrucksvoll darstellen und deshalb fast immer klinisch erkannt werden.

Bei den venösen Komplikationen sind die klinischen Zeichen weitaus weniger sensitiv und unspezifischer (Kakkar et al. 1969, Hull et al. 1977), weswegen vermutlich bei einem Teil der HIT-Patienten venöse Thrombosen nicht diagnostiziert wurden.

Die asymptomatischen Patienten der Gruppe III mit Heparin/PF4-Antikörpern wurden vor Entlassung mit der Farbduplex-Sonographie der tiefen Venen beider Beine prospektiv auf Thrombosen gescreent, so daß davon ausgegangen werden kann, daß diese Patienten keine thromboembolischen Komplikationen erlitten.

6.4 Bewertung des Heparin-induzierten Plättchen-Aktivierungstests (HIPA)

Da uns der Vergleich der Immunglobulinklassenmessung mittels ELISA mit einem funktionellen Test sinnvoll erschien, wurden alle eingeschlossenen Patienten ebenfalls mit dem von Greinacher et al. (1991) entwickelten Heparin-induzierten Plättchenaktivierungstest (HIPA) untersucht, der in vergleichenden Studien gute Ergebnisse für Spezifität und Sensitivität erzielt hat (Greinacher et al. 1992 und 1994 a).

Eine Untersuchung zur Validierung des HIPA-Tests in verschiedenen Labors, die diesen Test in Deutschland durchführen, belegt jedoch, daß dieser Test selbst in den Händen erfahrener Labors problematisch ist (Eichler et al. 1999): Es wurden die HIPA-Tests von neun Labors anhand von acht ausgewählten Serumproben miteinander verglichen. Nur zwei Labors hatten konkordante Ergebnisse, vier Labors unterschieden sich in einem Testergebnis und drei Labors hatten zwei und mehr diskrepante Ergebnisse.

Eine Ursache für die diskrepanten Ergebnisse liegt vermutlich in der Variabilität der Spenderthrombozyten bedingt durch den Fc γ RII-Rezeptorpolymorphismus, auch wenn der HIPA-Test nicht nur mit Thrombozyten von einem sondern von mindestens 3 bis 4 Spendern durchgeführt wird.

Die Verwendung eines einheitlichen Spenderpools, der genetisch auf Rezeptorpolymorphismen getestet ist, wäre erstrebenswert, ist aber aufgrund des enormen Aufwandes nur schwer realisierbar.

Auch mit dem Einsatz standardisierter, schwach wirkender Positivkontrollen ließe sich eine Verbesserung der Qualitätskontrolle erzielen, da häufig Patientenproben mit relativ niedrigen bzw. grenzwertigen Antikörperkonzentrationen falsch negativ seien (Eichler et al. 1999).

Falsch positive Ergebnisse entstehen oft durch unspezifische Thrombozytenaktivierungen, wie sie durch Thrombinreste in der untersuchten Serumprobe ausgelöst werden können.

Deshalb wird zur Optimierung der Spezifität der Einsatz monoklonaler Antikörper, die gegen den thrombozytären Fc γ RII-Rezeptor gerichtet sind, empfohlen (Lindhoff-Last et al. 2000). Sie können eine unspezifische, Antikörper unabhängige Aktivierung von einer spezifischen, Antikörper abhängigen unterscheiden, weil letztere durch derartige monoklonale Antikörper hemmbar ist (Kelton et al. 1988, Chong et al. 1989 b). Aber auch diese Modifikation ist sehr kostenaufwendig und daher zur Routinediagnostik ungeeignet.

Aus den angeführten Gründen scheint der HIPA-Test für die meisten Labors - das sind insbesondere solche mit geringem Probenaufkommen - ungeeignet, und die immunologischen Tests als Alternative gewinnen vor diesem Hintergrund um so mehr an Bedeutung.

Denn die ELISA-Technik hat wegen ihrer guten Praktikabilität und zumeist auch guten Sensitivität breite Anwendung im Laborbereich gefunden.

6.5 Bewertung des Heparin/PF4-Antikörper-ELISA

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir den von Amiral et al. (1991) entwickelten Heparin/PF4-Antikörper-ELISA (HPIA), der am häufigsten zur HIT-Diagnostik eingesetzt wird.

In dem kommerziell angebotenen Assay werden Heparin/PF4-Antikörper der Immunglobulinclassen IgG, IgM und IgA nachgewiesen.

Unsere Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen anderer Studien dahingehend überein, daß der Heparin/PF4-Antikörper-ELISA zumindest bezüglich der Sensitivität gut mit einem funktionellen Assay wie dem HIPA korreliert: Der ELISA zeigte bei der von Amiral et al. (1992) vorgeschriebenen Cut-Off Definition eine Sensitivität von 91,1 %, also etwas besser als der HIPA (86,7 %).

Wie bereits andere Autoren beschrieben haben (Greinacher et al. 1994 a, Arepally et al. 1995), fanden auch wir eine Diskrepanz zwischen den Patientenkollektiven, die jeweils im HIPA oder im Heparin/PF4-EIA als positiv bzw. negativ gewertet wurden:

Die HIT-Patienten der Gruppen I und II hatten in 13,3 % (6/45) ein negatives Testergebnis im Heparin-induzierten Plättchenaktivierungstest (HIPA). Umgekehrt betrug der Anteil, derer, die ein negatives Testergebnis im Heparin/PF4-ELISA negativ hatten 8,8 % (4/45).

Insgesamt hatten demzufolge 22,1 % aller HIT-Patienten diskrepante Ergebnisse, da beide Tests unterschiedliche pathophysiologische Phänomene messen.

Die klinische Spezifität des Heparin/PF4-ELISA scheint in Abhängigkeit von dem untersuchten Kollektiv zu variieren. Denn wie eingangs bereits erwähnt, haben Patienten mit bestimmten Grunderkrankungen oder Therapieverfahren eine höhere Wahrscheinlichkeit, Heparin/PF4-Antikörper zu entwickeln, ohne dabei jedoch klinisch symptomatisch zu werden.

In der prospektiven Untersuchung von gefäßchirurgischen Patienten auf Heparin/PF4-Antikörper, aus der die asymptomatischen Patienten der Gruppe III mit positiven Antikörpern stammen, waren im Laufe der Heparintherapie in 34 % Heparin/PF4-Antikörper im ELISA nachweisbar.

Kein Patient entwickelte jedoch klinisch eine HIT-Symptomatik, so dass, gemessen an diesem Kollektiv, die Spezifität der Immunglobulinklassenmischung aus IgG, IgM und IgA bei 0 % läge. Der HIPA-Test schnitt vergleichsweise mit einer Spezifität von 66 % deutlich besser ab.

Vergleicht man die Mediane der absoluten Absorptionswerte der einzelnen Gruppen für die Immunglobulinmischung aus IgG, IgM und IgA miteinander, so fällt auf, daß die der asymptomatischen Patienten aus Gruppe III niedriger sind als die der beiden Gruppen mit HIT-Patienten.

Da die Höhe der Absorptionswerte relativ gut mit den Antikörpermengen im Patientenblut korreliert, könnte man hieraus ableiten, daß Patienten mit niedrigen Antikörpertitern asymptomatisch bleiben und sich erst ab einer gewissen Schwelle eine klinische Manifestation einstellt. Folglich würde eine Anhebung des Cut-Offs, wie von Newman et al. (1998) vorgeschlagen, eine Reduktion falsch positiver Ergebnisse bewirken.

Jedoch führt die statistische Optimierung des Cut-Offs zwischen den symptomatischen und asymptomatischen Patienten, erreicht durch eine Anhebung des Cut-Offs von 0,5 auf 0,94, immer noch zu einer minimalen Fehlklassifikationsrate von 29 %.

Bedingt durch die großen Überschneidungen der Verteilungen der Immunglobulinmischung ist keine besonders scharfe Trennung zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten möglich, so daß im paarweisen Vergleich nach Dunn zwischen keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied nachweisbar ist ($p > 0,05$).

Hingegen kann der HIPA-Test signifikant zwischen dem asymptomatischen und symptomatischen Kollektiven unterscheiden ($p < 0,05$).

Durch die Cut-off Anhebung kann, bezogen auf die prospektiv untersuchten gefäßchirurgischen Patienten, eine Spezifitätssteigerung des Heparin/PF4-ELISA von 0 % auf 66,7 % erzielt werden, die damit geringfügig höher als die des funktionellen HIPA-Tests ist (66,6 %).

Dies wird allerdings durch nicht eine unbedeutende Abnahme der Sensitivität von 91 % auf 76 % erkauft, da auch einige der HIT-Patienten niedrige Absorptionswerte hatten, die dann als negativ gewertet werden.

Die mangelnde Spezifität eines Tests zur Diagnostik einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ II ist insbesondere dann im klinischen Alltag problematisch, wenn der Verdacht besteht, daß mehrere Ursachen gleichzeitig an einer Thrombozytopenie und thromboembolischen Komplikationen beteiligt sein könnten: So könnten zum Beispiel Heparin/PF4-Antikörper mit einer septisch bedingten Verbrauchskoagulopathie assoziiert sein, die ebenfalls mit einer Thrombozytopenie einhergeht.

Aufgrund der geringen Spezifität stellt sich die Frage, ob die nachgewiesenen Heparin/PF4-Antikörper mit dem thrombopenischen Geschehen kausal in Zusammenhang stehen und ob durch die Fortsetzung der Heparintherapie, die bei einer Verbrauchskoagulopathie möglicherweise indiziert ist, thromboembolische Komplikationen zu erwarten sind.

6.6 Diskussion der Subklassenanalyse

6.6.1 IgM

Aufgrund des Vergleiches der absoluten Absorptionsmeßwerte der Gruppen I und II mit HIT-Patienten und der Gruppe III mit den asymptomatischen Patienten gelangten wir zu dem Schluß, daß Heparin/PF4-Antikörper der Immunglobulinklasse IgM keine zentrale Bedeutung für die Pathogenese der Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ II haben.

Die absoluten Absorptionsmeßwerte bzw. deren Verteilungen zeigen nämlich, daß Heparin/PF4-Antikörper der Immunglobulinklasse IgM bei den beiden Gruppen mit HIT-Patienten und den asymptomatischen Patienten in nahezu identischen Konzentrationen nachweisbar sind. Die statistische Analyse im paarweisen Gruppenvergleich nach Dunn belegt dies. Eine signifikante Trennung der Gruppen I, II und III war nicht möglich ($p > 0,05$), und auch die hohe minimale Fehlklassifikationsrate von 40 %, die nahe an der Zufallswahrscheinlichkeit liegt, verdeutlicht, daß Immunglobulin IgM ungeeignet für eine Differenzierung der symptomatischen und asymptomatischen Patientengruppen ist.

Daß Immunglobulin IgM im gleichem Maße von asymptomatischen Patienten wie von Patienten mit HIT-Symptomatik gebildet wird, spricht gegen die Hypothese einer pathogenetischen Bedeutung dieser Klasse, wie sie von Amiral et al. (1996 c) aufgestellt wurde. Aus dem genannten Grund können die vorliegenden Befunde diese Hypothese nicht unterstützen.

Beruhend auf der Beobachtung, daß er HIT-Patienten fand, bei denen keine Heparin/PF4-Antikörper der Immunglobulinklasse IgG sondern nur IgM nachweisbar waren, postulierte er mehrere alternative Fc γ RII-Rezeptor unabhängige Pathomechanismen.

Zum einen schlug er eine IgM-abhängige Thrombozytenaktivierung vor, die durch den PF4-Rezeptor vermittelt wird, indem sich Heparin/PF4-Makromoleküle zusammen mit dem F(ab₂) Fragment des Immunglobulins IgM an diesen thrombozytären Oberflächenrezeptor heften.

Auch eine IgM abhängige Komplementfixation auf der Thrombozytenoberfläche mit konsekutiver Plättchenlyse oder eine Aktivierung der endothelabhängigen Gerinnung durch HIT-Antikörper aufgrund der Kreuzreaktivität der Endotheloberflächen und der Heparin/PF4-Antigenkomplexe sind seiner Meinung nach als Ursache für die Klinik der HIT Typ II denkbar.

Es muß betont werden, daß die Existenz dieser Pathomechanismen jedoch rein hypothetisch ist.

Da in der Studie von Amiral et al. (1996 c) ausschließlich Patienten mit einer HIT-Symptomatik, die unseren Gruppen I und II entsprechen, aber keine asymptomatischen Patienten mit Heparin/PF4-Antikörpern untersucht wurden, mußten sie automatisch auf eine pathogenetische Bedeutung der Immunglobulinklasse IgM schließen.

Nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, daß auch bei der vorliegenden Studie in der Gruppe IV bei drei Patienten in niedrigen Konzentrationen isoliert Immunglobuline der Klasse IgM nachgewiesen werden konnten, kann man an Hand dieser Daten davon ausgehen, daß Heparin/PF4-IgM-Antikörper nur Epiphänomene sind, die während der Heparin-gabe durch Sensibilisierung auftreten können, für die Klinik der Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ II aber keine Bedeutung haben.

Denn bei diesen Patienten normalisierte sich die anfängliche Thrombozytopenie trotz Fortsetzung der Heparintherapie innerhalb von Tagen, eine wahrscheinlichere Ursache für die Thrombozytopenie lag vor und der Heparin-induzierte Plättchenaktivierungstest (HIPA) fiel negativ aus, so daß eine HIT Typ II mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte.

Sowohl die drei Patienten mit positivem Testergebnis für Immunglobulin IgM als auch der überwiegende Teil der positiven Patienten der Gruppe III hatten niedrige Absorptionsmeßwerte, die nur grenzwertig über dem festgelegtem Cut-Off von 0,2 lagen.

6.6.2 IgA

Was für die Immunglobulinklasse IgM formuliert wurde, läßt sich nach den vorliegenden Ergebnissen auch in etwa auf die Immunglobulinklasse IgA übertragen.

Amiral et al. (1996 c) fanden in ihrer Untersuchung neben HIT-Patienten mit isolierten Heparin/PF4-Antikörpern der Immunglobulinklasse IgM ebenso Patienten, bei denen ausschließlich Antikörper der Immunglobulinklasse IgA nachweisbar waren.

Der Pathomechanismus für Immuglobulinklasse IgA, so vermuteten sie, sei ebenfalls Fc γ RII-Rezeptor unabhängig und vermittelt durch aktivierte Monozyten und Neutrophile, deren Fc α R-Oberflächenrezeptor Immunglobulin IgA binden kann.

Auch dieser Hypothese kann aufgrund der vorliegenden Befunde nicht zugestimmt werden, denn die Absorptionsmeßwerte der Immunglobulinklasse IgA veranschaulichen, was der Dunn-Test statistisch belegt: Die Unterschiede zwischen den symptomatischen Patienten (Gruppe I und II) und den asymptomatischen Patienten (Gruppe III) sind nicht signifikant ($p > 0,05$), sondern die Verteilungen der Meßwerte sind sehr ähnlich, woraus abgeleitet werden kann, daß auch die Immunglobulinklasse IgA keine Rolle in der Pathogenese der Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ II zu spielen scheint.

Diese Annahme wird zudem dadurch gestützt, daß kein einziger Patient mit einer HIT-Symptomatik und isoliertem Immunglobulin IgA gefunden werden konnte, sondern daß immer neben IgA-Antikörper auch IgG-Antikörper vorlagen, obwohl die Gruppe der HIT-Patienten mit isolierter Thrombozytopenie (Gruppe II) von alle Gruppen den größten Patientenanteil mit positivem IgA hatten.

Daß in der Gruppe III Patienten ohne klinische Manifestation mit isolierter, zum Teil deutlicher Erhöhung der Immunglobulinklasse IgA zu finden waren, ist ein weiteres Indiz dafür, daß diese Klasse keine Symptomatik auslöst.

Ungeklärt bleibt, warum immerhin 3 der 7 Patientenseren mit isolierten IgA-Antikörpern eine Plättchenaggregation im HIPA induzieren konnten, obwohl dieser Test ausschließlich den FcγRII-Rezeptor- bzw. IgG-abhängigen Mechanismus nachweisen soll.

Nach neueren Erkenntnissen könnte die Ursache hierfür eine unspezifische Thrombozytenaktivierung, ausgelöst durch Thrombinspuren in den Testseren sein (Lindhoff-Last et al. 2000).

6.6.3 IgG

Es ist bekannt, daß der FcγRII-Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche nur in der Lage ist, Immunglobulin IgG zu binden, nicht aber IgM oder IgA.

Ausgehend von diesem theoretischem Ansatz konnte die zentrale Rolle des FcγRII-Rezeptors in der Pathogenese der Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ II durch die vorliegende laborchemischen Untersuchungen bestätigt werden.

In Gruppe II mit HIT-Patienten ohne thromboembolische Komplikationen hatte jeder und in der Gruppe I mit HIT-Patienten mit thromboembolischen Komplikationen hatten 88 % aller Patienten positive Heparin/PF4-Antikörper der Immunglobulinklasse IgG.

Der Unterschied der Absorptionsmeßwerte zwischen den beiden Gruppen mit HIT-Patienten auf der einen Seite und der Gruppe III mit den asymptomatischen Patienten und positiven Heparin/PF4-Antikörpern war signifikant ($p < 0,05$), was zeigt, daß Immunglobulin IgG den Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer HIT Typ II darstellt.

Daher eignet sich diese Immunglobulinklasse auch am besten für die Differenzierung der symptomatischen HIT Patienten aus Gruppe I und II von den asymptomatischen Patienten mit Heparin/PF4-Antikörpern, wie der Vergleich von IgG und Immunglobulinmischung beweist: Die Fehlklassifikationsrate für die isolierte Bestimmung von IgG liegt mit 20 % rund 9 % unter der der Mischung aus IgG, IgM und IgA.

Hierbei ist von großer Bedeutung, daß der Trennwert der minimalen Fehlklassifikationsrate im Vergleich zum vordefinierten Cut-Off von 0,2 nur geringfügig auf 0,31 erhöht werden mußte. Damit ist der Verlust an Sensitivität von etwa 2 % auf 89 % nicht so ausgeprägt wie für die Immunglobulinmischung.

Gleichzeitig wird aber ein zusätzlicher Gewinn an Spezifität von 8 auf insgesamt 71 % erzielt, so dass in der Zusammenschau beider Größen die Immunglobulinklasse IgG der Mischung überlegen ist.

Der Vergleich mit dem Heparin-induzierten Plättchenaktivierungstest (HIPA) zeigt, daß der Heparin/PF4-ELISA bei einer isolierten Bestimmung von Immunglobulin IgG bezüglich der Sensitivität und Spezifität mit einem funktionellen Test konkurrieren kann und bietet dabei gleichzeitig den Vorteil der deutlich besseren Praktikabilität und Reproduzierbarkeit.

Ferner hat der Vergleich der HIT-Patienten mit thromboembolischen Komplikationen und der HIT-Patienten mit isolierter Thrombozytopenie gezeigt, daß auch bezüglich der Immunglobulinklasse IgG kein statistisch signifikanter Unterschied zu finden ist ($p > 0,05$), wengleich der Median der absoluten Absorptionsmeßwerte für die Gruppe II geringfügig höher lag.

Hieraus lässt sich schlussfolgern, daß die Höhe des Absorptionsmeßwertes bzw. der Konzentration der Immunglobulinklasse IgG kein Maß dafür ist, ob die Thrombozytopenie als alleiniges Symptom klinisch manifest wird oder ob die weitaus mehr gefürchteten thromboembolischen Komplikationen hinzutreten.

Eine Beziehung zwischen der Höhe eines HIT-Antikörpertiters und der Schwere der Thrombozytopenie bzw. der klinischen Manifestation wurde von anderen Autoren vermutet (Greinacher et al. 1995 a).

Die vorliegenden klinischen Daten belegen jedoch, daß bezüglich der Schwere der Thrombozytopenie zwischen den beiden Gruppen mit HIT-Patienten kein wesentlicher Unterschied festzustellen ist.

Zu vermuten ist, daß der Grad der klinischen Manifestation in der vorliegenden Untersuchung viel wesentlicher von anderen Faktoren bestimmt wurde.

So betrug die Dauer der Heparintherapie der HIT-Patientengruppe mit isolierter Thrombozytopenie im Mittel etwa 11 Tage und war damit fast vier Tage kürzer als die der HIT-Gruppe mit thromboembolischen Komplikationen.

Der überwiegende Teil der HIT-Patienten der Gruppe I entwickelte arterielle und venöse thromboembolische Komplikationen erst ab jenem Zeitpunkt, zu dem die Heparintherapie der Patienten mit isolierter Thrombozytopenie bereits sistierte.

Es wird daher vermutet, daß auch die Patienten mit isolierter Thrombozytopenie mit zunehmender Therapiedauer möglicherweise einem steigenden Thromboserisiko ausgesetzt gewesen wären, unabhängig von der Antikörpertiterhöhe.

Warkentin et al. (1996 b) machten Beobachtungen, die diese Annahme stützen:

Sie fanden, daß das konsekutive 30-Tage-Risiko für thromboembolische Komplikationen bei HIT-Patienten mit einer isolierten Thrombozytopenie trotz Absetzen des Heparins über 50 % liegt.

Dieses Risiko war unabhängig vom Einsatz eines Cumarin-Derivates oder dem totalen Verzicht auf Antikoagulation. Es kann spekuliert werden, dass bei Fortsetzung der Heparintherapie das thromboembolische Risiko sicherlich noch deutlich angestiegen wäre.

Das belegt die Bedeutung einer raschen und zuverlässigen Diagnosesicherung für den klinischen Verlauf der HIT Typ II.

Mit dem vorliegenden Gruppenvergleich läßt sich die zentrale pathogenetische Bedeutung der Immunglobulinklasse IgG bestätigen.

Daß dennoch bei 38 % (9/24) der asymptomatischen Patienten aus Gruppe III Heparin/PF4-Antikörper der Immunglobulinklasse IgG nachgewiesen werden konnte, steht in keinem Widerspruch zu dieser Theorie. Denn andere Studien haben darauf hingewiesen, daß neben der Immunisierung gegen Heparin/PF4-Antigen weitere Faktoren eintreten müssen, damit sich eine HIT Typ II manifestiert.

Ob genetische Faktoren wie der Polymorphismus des thrombozytären Fc γ RII-Rezeptors hier eine entscheidende Rolle spielen, bleibt auch nach den neuesten Erkenntnissen ungeklärt.

Burgess et al. (1995) und Brandt et al. (1995) fanden, daß der His/His 131 Phenotyp mit einer höheren Frequenz bei HIT-Patienten vorkommt als Arg/Arg 131 Phenotyp, der weniger kompatibel mit den Heparin/PF4-Antikörpern zu sein scheint. Sie schlußfolgerten, daß

Patienten mit His/His 131 Phenotyp "High-Responder" sind, was jedoch durch Arepally et al. (1997) und Bachelot-Loza et al. (1998) nicht bestätigt werden konnte.

Dennoch ist eine Schlüsselrolle des thrombozytären Fc γ RII-Rezeptors zur Erklärung dieses Phänomens in anderer Hinsicht denkbar:

Es wird diskutiert, daß das klinische Bild einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ II, ebenso wie die Bildung von Heparin/PF4-Antikörpern, überzufällig häufig mit bestimmten Grunderkrankungen einhergeht.

Insbesondere könnten Krankheiten in Betracht kommen, die zu einer lokalen oder systemischen Thrombozytenaktivierung und damit zu einem präthrombotischen Stadium führen.

Eine Voraktivierung geht mit einer Zunahme der Rezeptordichte auf der Thrombozytenoberfläche einher, was eine verstärkte Empfindlichkeit der Thrombozyten gegenüber IgG-Antikörper bewirkt und die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß diese eine weitere Thrombozytenaktivierung bis hin zur Thrombozytopenie und Thrombosenentstehung triggern können.

Daß in einer Normalpopulation die Rezeptordichte sehr heterogen ist, könnte bereits ein Erklärungsansatz für das Phänomen sein, warum nicht alle Patienten mit Antikörpern eine klinische Symptomatik entwickeln (Anderson et al. 1995).

In unserem unselektierten HIT-Patientengut fanden sich mit Abstand am häufigsten (50 %) Patienten, die einem traumatologischen bzw. orthopädischen operativen Eingriff an der unteren Extremität unterzogen wurden. Seit langem ist bekannt, dass derartige Eingriffe prinzipiell als Hochrisikosituationen für thromboembolische Komplikationen einzustufen sind, d.h. mit einem geschätzten Risiko unbehandelt von etwa 50 % für proximale und distale venöse Thrombosen einhergehen (Gallus et al. 1976, Hume et al. 1976).

Bedingt wird dieses Phänomen vor allem durch den chirurgischen Eingriff selbst, der per se einen höheren thrombotischen Risikofaktor als z.B. die gleichzeitig bestehende Immobilisation darstellen soll: Zum einen wird durch das Gewebetrauma in Abhängigkeit von der Defektgröße Gewebethromboplastin freigesetzt (Borgstrom et al. 1959). Außerdem konnte bei Operationen mit Hüftgelenkersatz mittels intraoperativer Phlebographie gezeigt werden, daß der Abschnitt der Vena femoralis, der in enger räumlicher Beziehung zum Operationsgebiet liegt, Zerr- und Torsionswirkungen ausgesetzt ist, die dort vermutlich zu starken En-

dothelalterationen führen (Stamatakis et al. 1978). Bei beiden Vorgängen ist mit einer lokalen Gerinnungsaktivierung zu rechnen, die direkt oder indirekt zu einer Plättchenaktivierung führen und damit bei Immunisierung gegen Heparin/PF4-Komplex einen bahrenden Effekt für die Entstehung einer HIT Typ II haben könnte.

Im Vergleich zu den anderen Grunderkrankungen bzw. Therapieverfahren scheinen HIT-Patienten mit orthopädisch-traumatologischen Eingriffen vergleichsweise stärker zu isolierten venösen Thrombosen zu neigen, was vermutlich insbesondere auf die lokale Gefäßwanddestruktion des benachbarten Venensystems zurückzuführen ist. Die prospektive Studie mit Hüftoperierten von Warkentin et al. (1995) kam diesbezüglich zu ähnlichen Ergebnissen. Hier hatten 7 der 9 prospektiv gefundenen HIT-Patienten isolierte venöse Thrombosen.

Patienten mit Gefäßerkrankungen als Behandlungsgrund entwickelten dagegen häufiger eine isolierte Thrombozytopenie oder arterielle Thrombosen, unabhängig davon, ob sie operativ oder konservativ behandelt wurden.

Die Inzidenz von HIT-Antikörpern und die Manifestation einer Klinik scheint bei Patienten mit gefäß- bzw. herzchirurgischen Eingriffen deutlich stärker zu divergieren, als das bei Patienten mit traumatologischen oder orthopädischen Eingriffen der Fall ist, d.h. gefäß- und herzchirurgische Patienten mit positiven Antikörpern bekommen vergleichsweise viel seltener eine HIT Typ II (Warkentin et al. 1995 und 2000, Visentin et al. 1996, Suh et al. 1997, Lindhoff-Last et al. 2000).

Hieraus resultiert eine schlechtere klinische Testspezifität für Patienten nach gefäß- und herzchirurgischen Eingriffen.

Wenn Zustände, die mit einer gesteigerten Thrombozytenaktivierung einhergehen, als bahrender Faktor wirken können, hätte man bei den gefäßchirurgischen Patienten mit HIT-Antikörpern mit einer stärkeren Ausprägung der HIT-Symptomatik rechnen dürfen. Denn es ist bekannt, dass im Rahmen von Gefäßerkrankungen eine lokale Voraktivierung der Thrombozyten durch erhöhte Scherkräfte, bedingt durch Stenosen, oder durch freiliegendes subendotheliales Kollagen auftritt.

Trotzdem waren HIT-Patienten mit kardialen und vaskulären Erkrankungen in der vorliegenden Studie unter den chirurgischen Patienten immerhin am zweithäufigsten und unter den

konservativ behandelten sogar am häufigsten. Das zeigt, daß auch diese Patienten gefährdet sind. Andere chirurgische Eingriffe, wie beispielsweise abdominelle Eingriffe, traten deutlich seltener im Kollektiv der HIT-Patienten auf.

Von einem optimalen Testsystem sollte daher zu erwarten sein, daß es unabhängig von der Grundkrankheit gleich gut zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten unterscheiden kann.

Zusammenfassend ließ sich zeigen, daß sich hierfür die isolierte Bestimmung von Heparin/PF4-Antikörpern der Immunglobulinklasse IgG eignet und damit der Immnglobulinmischung vorzuziehen ist. Erstere konnte im Gegensatz zur Mischung signifikant zwischen symptomatischen und asymptomatischen Patienten unterscheiden und erreichte eine ähnlich gute Sensitivität und Spezifität wie der funktionelle HIPA-Test, der nur für ausgewählte Labors praktikabel scheint. Eine signifikante Differenzierung zwischen HIT-Patienten mit und ohne thromboembolische Komplikationen ist weder mit dem HIPA-Test noch mit einer der untersuchten Immunglobulinklassen möglich, so daß davon auszugehen ist, daß noch andere bisher nicht identifizierte Faktoren maßgeblich an der Entstehung der thromboembolischen Komplikationen im Rahmen der HIT beteiligt sein müssen.

7. Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass nicht alle Patienten, die sich unter einer Heparintherapie nachweislich gegen Heparin/PF4-Komplex immunisieren, das klinische Bild einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) Typ II entwickeln, wenngleich Heparin/PF4-Antikörper ursächlich für diese schwerwiegende Nebenwirkung angeschuldigt werden.

Es ist davon auszugehen, dass in Abhängigkeit von der Grunderkrankung der Anteil der Patienten mit Heparin/PF4-Antikörpern, der keine Klinik entwickelt, relativ groß ist. Da die bisher entwickelten Testsysteme auf dem Nachweis von Heparin/PF4-Antikörpern beruhen, wirkt sich dieses Phänomen nachteilig auf die Testspezifität aus.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche der Immunglobulinklassen der HIT-spezifischen Antikörper für die Auslösung einer HIT Typ II von Bedeutung sind, und inwieweit die isolierte Bestimmung einer der Immunglobulinklassen IgG, IgM und IgA in der Lage ist, die Aussagekraft eines immunologischen Testsystems zu verbessern.

Hierzu wurden Patienten, bei denen Heparin/PF4-Antikörper nachweisbar waren, nach klinischen Kriterien in drei verschiedene Gruppen unterteilt und bezüglich der Immunglobulinklassen verglichen.

In Gruppe I wurden Patienten zusammengefasst, bei denen sich der klinische Verdacht einer HIT Typ II labor diagnostisch durch Heparin/PF4-Antikörpernachweis bestätigte, und die als besonderes Kriterium thromboembolische Komplikationen entwickelten. Patienten mit einer isolierten Heparin-induzierten Thrombozytopenie und positivem Antikörpernachweis aber ohne thromboembolische Komplikationen wurden als Gruppe II unterschieden. Durch die getrennte Beobachtung dieser beiden Patientengruppen sollte der prädiktive Wert der Immunglobulinklassen für die Entwicklung von Thrombosen unter HIT Typ II untersucht werden.

Verglichen wurden diese beiden Gruppen mit einer dritten Gruppe von selektierten Patienten aus einer prospektiven Studie. Die eingeschlossenen gefäßchirurgischen Patienten aus dieser Studie mussten die Kriterien „positiver Heparin/PF4-Antikörpernachweis während Heparin-

rintherapie“ und „keine klinischen Zeichen einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ II“ erfüllen.

In dieser Arbeit wurde weiter untersucht, welche der Immunglobulinklasse IgG, IgM und IgA am besten zwischen Patienten mit positiven Heparin/PF4-Antikörpern mit und ohne typischer „HIT-Klinik“ unterscheiden kann.

Die Bestimmung der Immunglobulinklassen erfolgte zum Zeitpunkt des akuten thrombozytopenischen Geschehens, bzw. bei den asymptomatischen Patienten in einem Zeitfenster von 5 bis 20 Tagen nach Therapiebeginn mit einer ELISA-Methode nach Amiral et al. (1991). Parallel zu den immunologischen Untersuchungen wurde ein etablierter, funktioneller Test, der Heparin-induzierte Plättchenaktivierungstest (HIPA) von Greinacher et al. (1991) bei allen Patienten angewandt.

Es kam zu folgenden Ergebnissen im Vergleich der Gruppen:

Die Patienten mit einer HIT Typ II mit thromboembolischen Komplikationen ließen sich durch keine der untersuchten Immunglobulinklasse oder den Heparin-induzierten Plättchenaktivierungstest (HIPA-Test) signifikant von den Patienten mit HIT ohne thromboembolische Ereignisse unterscheiden.

Die asymptomatischen Patienten mit positivem Heparin/PF4-Antikörpernachweis waren signifikant ($p < 0,05$) von den Patienten mit einer klinisch wahrscheinlichen und laborchemisch nachgewiesenen HIT Typ II zu unterscheiden durch die Immunglobulinklasse IgG und den Heparin-induzierten Plättchenaktivierungstest (HIPA-Test), nicht aber durch die Immunglobulinklassen IgM und IgA.

Dementsprechend zeigte IgG in der Diskriminanzanalyse zwischen Patienten mit klinisch eindeutigem HIT Typ II und asymptomatischen Patienten mit positivem Heparin/PF4-Antikörpernachweis mit 20 % eine um 9 % niedrigere Fehlklassifikationsrate als die Mischung aus IgG, IgM und IgA.

Der durch die Diskriminanzanalyse optimierte Cut-Off konnte zwar für die Mischung aus IgG, IgM und IgA eine Spezifitätssteigerung von 0 auf 66,6 % erzielen, dies verursachte jedoch einen Verlust an Sensitivität von 91 % auf 76 %.

Der Verlust an Sensitivität ist bei der Immunglobulinklasse IgG mit 2 % deutlich günstiger, während die Spezifität zusätzlich durch die Cut-Off Optimierung von 62,5 auf 70,8 % gesteigert werden konnte.

Damit ist der Heparin/PF4-Antikörper-EIA mit der isolierten Bestimmung der Immunglobulinklasse IgG bei vergleichbarer Sensitivität spezifischer als der funktionelle HIPA-Test.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich bestätigen, dass die Immunglobulinklasse IgG eine zentrale Rolle in der Pathogenese spielt, während die Klassen IgM und IgA keinen Einfluß auf die Klinik der HIT Typ II zu haben scheinen.

Da nicht alle Patienten mit Heparin/PF4-Antikörpern der Klasse IgG eine HIT Typ II entwickeln, müssen weitere Faktoren am Zustandekommen der klinischen Symptomatik beteiligt sein.

Weiter lässt sich schlussfolgern, dass der Heparin/PF4-Antikörper-EIA (HPIA), sofern man nur die relevante Immunglobulinklasse IgG misst, ein brauchbares Instrument zur Diagnostik der HIT Typ II darstellt, und daher von weniger spezialisierten Labors wegen seiner besseren Praktikabilität einem funktionellen Test wie dem HIPA-Test vorgezogen werden sollte.

Zwischen Immunglobulinklassen und dem Risiko, ein thromboembolisches Ereignis während einer HIT Typ II zu entwickeln, konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

Es ist zu vermuten, dass der überwiegende Teil der Patienten mit initial isolierter Thrombozytopenie bei fortlaufender Therapiedauer auch Thrombosen entwickelt hätte und sich die beiden Patientengruppen I und II nur hinsichtlich der Dauer der Heparintherapie unterscheiden.

Literaturverzeichnis

1. Amiral J., Bridey F., Dreyfus M., Vissac A.M., Fressinaud E., Wolf M., Meyer D.
PF4 complexed with heparin is the target for antibodies generated in HIT
Thrombosis and Haemostasis (1992) 68: 95 - 96
2. Amiral J., Bridey F., Wolf M., Boyer- Neumann C., Fressinaud E., Vissac A.M.,
Peynaud- Debayle E., Dreyfus M., Meyer D.
Antibodies to macromolecular PF4-heparin complexes in HIT: a study of 44 cases
Thrombosis Haemostasis (1995) 73: 21 - 28
3. Amiral J., Marfaing-Koka A., Wolf M., Alessi M.C., Tardy B., Boyer-Neumann C.,
Vissac A.M. Fressinaud, Poncz M., Meyer D.
Presence of autoantibodies to interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients
with HIT
Blood (1996 a) 88: 410 – 416
4. Amiral J., Peynaud-Debayle E., Wolf M., Bridey F., Vissac A.M., Meyer D.
Generation of antibodies to heparin-PF4 complexes without thrombocytopenia in pa-
tients treated with unfractionated and low-molecular-weight heparin
American Journal of Hematology (1996 b) 52: 90 - 95
5. Amiral J., Wolf M., Fischer A.M., Boyer-Neumann C., Vissac A.M., Meyer D.
Pathogenicity of IgA and/or IgM antibodies to heparin-PF4 complexes in patients with
HIT
British Journal of Haematology (1996 c) 92: 954 – 959
6. Anderson C.L., Chako G.W., Osborne J.M., Brandt J.T.
The Fc Receptor for immunoglobulin G (Fc γ IIA) on human platelets
Seminars in Thrombosis and Hemostasis (1995) 21: 1 - 9

7. Andersson L.O., Barrowcliffe T.W., Holmer E., Johnson E.A., Sims G.E.C
Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin III and by gel filtration
Thrombosis Research (1976) 15: 575 - 583
8. Ansell J., Slepchuk N., Kumar R., Lopez A., Southard L., Deykin D.
HIT: a prospective study
Thrombosis Haemostasis (1980); 43: 61-65
9. Arepally G., Poncz M., McKenzie S.E., Cines D.
Characterisation of the subclass specificity and antigenic determinants in HIT
Blood (1994) 84: 189a, abstract 740
10. Arepally G., Reynolds C., Tomaski A., Amiral J., Jawad A., Poncz M., Cines D.
Comparison of PF4/heparin ELISA assay with the ¹⁴C-serotonin release assay in the diagnosis of HIT
American Journal of Clinical Pathology (1995) 104: 648 – 654.
11. Arepally G., McKenzie S.E., Jiang X.M., Poncz M., Cines D.
FcγRIIA H/R131 polymorphism, subclass-specific IgG anti-heparin/platelet factor 4 antibodies and clinical course in patients with HIT and thrombosis
Blood (1997) 89: 370 - 375
12. Bachelot-Loza C., Saffroy R., Lasne D., Chatellier G., Aiach M., Rendu F.
Importance of the FcγRIIa-Arg/His-131 polymorphism in HIT
Thrombosis Haemostasis (1998) 79: 523 - 528

13. Barrowcliffe, T.W., Johnson E.A., Eggleton C.A., Kemball-Cook G., Thomas D.P.
Anticoagulant activities of high and low molecular weight heparin fractions
British Journal of Haematology (1979) 41: 573 - 582
14. Bell W.R., Tomasula P.A., Alving B.M., Duffy T.P.
Thrombocytopenia occurring during administration of heparin: a prospective study in
52 patients
Annals of Internal Medicine (1976) 85: 155 - 160
15. Borgstrom S., Gelin L.E., Zenderfeldx B.
The formation of vein thrombi following tissue injury
Acta Chirurgica Scandinavica (1959) (Suppl.) 247: 1
16. Boshkov L.K., Warkentin T.E., Hayward C.P.M., Andrew M., Kelton J.G.
HIT and thrombosis: clinical and laboratory studies
British Journal of Haematology (1993) 84: 322 - 328
17. Brady J., Riccio J.A., Yumen O.H.
Plasmapheresis. A therapeutic option in the management of HAT with thrombosis
American Journal of Clinical Pathology (1991) 96: 394 - 397
18. Brandt E., Flad H.D.
Structure and function of platelet-cytokines of the β -thromboglobulin/ interleukin 8
family
Platelets (1992) 3: 295 - 305
19. Brandt J.T., Isenhardt C.E., Osborne J.M., Ahmed A., Anderson C.L.
On the role of platelet Fc γ RIIa phenotype in HIT
Thrombosis and Haemostasis (1995) 74: 1564 - 1572

20. Breddin K.H.
Thromboseprophylaxe mit unfraktioniertem und niedermolekularem Heparin
Wiener Medizinische Wochenschrift (1989) 23: 555 - 558
21. Briant L., Caranobe C., Saivin S., Sie P., Bayrou B., Houin G., Boneu B.
Unfractionated heparin and CY 216: pharmacokinetics and bioavailabilities of the anti-factor Xa and IIa effects after intravenous and subcutaneous injection in rabbit
Thrombosis Haemostasis (1989) 61: 348 - 353
22. Burgess J.K., Lindeman R., Chesterman C.N., Chong B.H.
Single amino acid mutation of Fcγ receptor is associated with the development of HIT
British Journal of Haematology (1995) 91: 761 - 766
23. Cadroy Y., Amiral J. Raynaud H., Brunel , Mazaleyrat A., Sauer M., Sie P.
Evolution of antibodies anti-PF4/heparin in a patient with a history of HIT reexposed to heparin
Thrombosis Haemostasis (1994) 72 (5): 783-784
24. Capitano A.M., Niewiarowski S., Rucinski B., Tuszynski G.P., Cierniewski C.S., Hershock D., Kornecki E.
Interaction of platelet factor 4 with human platelets
Biochimica Biophysica Acta (1985) 839: 161
25. Carreras L.O.
Thrombosis and thrombocytopenia induced by heparin
Scandinavian Journal of Haematology (1980) 36: 66 - 80
26. Choay J., Petitou M., Lormeau J.C., Sinay P., Casu B., Gatti G.
Structure activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti factor Xa activity
Biochemical and Biophysiological Research Communications (1983) 116: 492 - 499

27. Choay J.
Structure and activity of heparin and its fragments: an overview
Seminars of Thrombosis and Hemostasis (1989) 15: 4
28. Chong B.H., Pitney W.R., Castaldi P.A.
HIT: association of thrombotic complications with heparin-dependent IgG antibodies that induce thromboxane synthesis in platelet aggregation
Lancet (1982) 2(8310): 1246 – 1249
29. Chong B.H., Berndt M.C.
HIT
Blut (1989 a) 58: 53-57
30. Chong B.H., Ismail F.
The mechanism of heparin-induced platelet aggregation
European Journal of Haematology (1989 b) 43: 245 - 251
31. Chong B.H., Castaldi P.A.
Platelet proaggregating effect of heparin: possible mechanism for the non-immune HAT
Australian and New Zealand Journal of Medicine (1990) 16: 715 - 716
32. Chong B.H., Burgess J., Ismail F.
The clinical usefulness of the platelet aggregation test for the diagnosis of HIT
Thrombosis Haemostasis (1993 a) 69: 344 - 350
33. Chong B.H., Pilgrim R.L., Cooley M.A., Cheesterman C.N.
Increased expression of platelet IgG Fc receptors in immune HIT
Blood (1993 b) 81: 988 - 993

34. Chong B.H., Murray B., Berndt M.C.,
Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders
Blood (1994) 83: 1535 - 1543
35. Chong B.H.
HIT
British Journal of Haematology (1995); 89:431 - 439
36. Chong B.H.
Low molecular weight heparinoid and HIT
Australian and New Zealand Journal of Medicine (1996) 26: 331
37. Cimo P.L., Moake J.L., Weinger R.S.,
HIT: association with platelet-aggregating factor and arterial thrombosis.
American Journal of Hematology (1979) 6: 595 - 608
38. Cines D.B., Tomaski A., Tannebaum S.
Immune endothelial-cell injury in HAT
New England Journal of Medicine (1987) 316: 581 – 589
39. Consensus conference:
Prevention of deep venous thrombosis and pulmonary embolism
Journal of the American Medical Association (1986) 256: 744 - 749
40. Crafoord C.
Preliminary report on postoperative treatment with heparin as a prevention of throm-
bosis
Acta Chirurgica Scandinavica (1937) 79: 407 - 426

41. Denomme G.A., Warkentin T.E., Horsewood P., Shephard J.I., Warner M.N., Kelton J.G.
Activation of platelets by sera containing IgG₁ heparin-dependent antibodies: an explanation for the predominance of the FcγRIIa “low responder” (his₁₃₁) gene in patients with HIT
Journal of Laboratory and Clinical Medicine (1997) 130 (3): 278 - 284
42. Eichinger S., Kyrle P.A., Brenner B., Wagner B., Kapiotis S., Lechner K., Korniger H.C.
Thrombocytopenia associated with low-molecular-weight heparin
Lancet (1991) 337: 1425 - 1426
43. Eichler P., Budde U, Haas S., Kroll H., Loreth R.M., Meyer O., Pachmann U., Pötzsch B., Schabel A., Albrecht D., Greinacher A.
First workshop for detection of heparin-induced antibodies: validation of the heparin-induced platelet-activation test (HIPA) in comparison with a PF4/heparin ELISA
Thrombosis and Haemostasis (1999) 81: 625 - 629
44. Ernest D.,Fisher M.M.
HIT complicated by bilateral adrenal haemorrhage
Intensive Care Medicine (1991) 17: 238 - 240
45. European Consensus Statement:
prevention of venous thromboembolism
International Angiology (1992) 11: 151 - 159
46. Fareed J.
Heparin, its fractions, fragments and derivatives. Some newer perspectives
Seminars of Thrombosis and Hemostasis (1985) 1: 1 - 9

47. Fratantoni J.C., Pollet R., Gralnick H.R.
HIT: confirmation of diagnosis with in vitro methods
Blood (1975) 45: 395 - 401
48. Gallus A.S., Hirsh J., Hull R.D., vna Aken W.G.
Diagnosis of venous thromboembolismen
Seminars in Thrombosis and Hemostasis (1976) 2: 203
49. Gallus A.S., Goodall K.T., Beswick W., Chesterman C.N.
HAT: case report and prospective study
Australian and New Zealand Journal of Medicine (1980) 10: 25 - 35
50. George J.N., Woolf S.H., Raskob G.E., Wasser J.S., Aledort L.M., Ballem P.J.,
Blanchette V.S., Bussel D.B., Kelton J.G., Lichtin A.E., McMilan R.
Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit
methods for the American Society of Hematology
Blood (1996) 88: 3 - 40
51. Goad K.E., Horne III M.K., Gralnick H.R.
Pentosan-induced thrombocytopenia: support for an immune complex mechanismen
British Journal of Haematology (1994) 88: 803 - 808
52. Gollub S., Ulin A.W.
HIT in man
Journal of Laboratory and Clinical Medicine (1962) 59: 430 - 435
53. Green D., Harris K., Reynolds N., Roberts M., Patterson R.
Heparin immune thrombocytopenia: Evidence for a heparin-platelet complex as the an-
tigenic determinant
Journal of Laboratory and Clinical Medicine (1978) 91: 167 – 175

54. Greinacher A., Michels I., Kiefel V., Mueller-Eckhardt C.
A rapid and sensitive test for diagnosing HAT
Thrombosis and Haemostasis (1991) 66: 734 - 736
55. Greinacher A., Michels I., Müller-Eckhardt C.
HAT: the antibody is not heparin specific
Thrombosis and Haemostasis (1992) 67 (5): 545 - 549
56. Greinacher A., Michels I., Liebenhoff U., Presek P., Mueller-Eckhardt C.
HAT: immune complexes are attached to the platelet membrane by the negative charge
of highly sulphated oligosaccharides
British Journal of Haematology (1993 a) 84: 711 - 716
57. Greinacher A., Michels I., Schäfer M., Kiefel V., Mueller-Eckhardt C.
HAT in a patient treated with polysulphated chondroitin sulphate: evidence for immu-
nological crossreactivity between heparin and polysulphated glycosaminoglycans
British Journal of Haematology (1993 b) 81: 252
58. Greinacher A., Amiral J., Dummel V., Vissac A., Kiefel V., Mueller-Eckhardt C.
Laboratory diagnosis of HAT and comparison of platelet aggregation test, heparin-
induced platelet-activation and PF4/heparin enzyme-linked immunosorbent assay
Transfusion (1994 a) 34: 381 – 387
59. Greinacher A., Liebenhoff U., Kiefel V., Presek P., Müller-Eckhardt C.
HAT: The effect oft various intravenous IgG preparations on antibody mediated plate-
let activation- a possible new indication for high dose i.v. IgG
Thrombosis and Haemostasis (1994 b) 65: 796

60. Greinacher A., Pötsch B., Amiral J., Dummel V., Eichner A., Mueller-Eckhardt C.
HAT: isolation of the antibody and characterisation of a multimolecular PF4-heparin complex as the major antigen
Thrombosis and Haemostasis (1994 c) 71: 247 - 251
61. Greinacher A.
Antigen generation in heparin-associated thrombocytopenia: the nonimmunologic type and the immunologic type are closely linked in their pathogenesis
Seminars in Thrombosis and Hemostasis (1995 a) 21: 82 - 92
62. Greinacher A., Völpel H., Poetzsch B.
Recombinant hirudin (HBW 023) in the treatment of patients HAT: a prospective study (abstract)
Thrombosis and Haemostasis (1995 b) 73: 1456
63. Greinacher A., Völpel H., Poetzsch B.
Recombinant hirudin in the treatment of HIT
Blood (1996 a) 88 (Suppl. 1): 281a
64. Greinacher A., Zinn S., Wizemann , Birk U.W.
Heparin-induced antibodies as a risk factor for thromboembolism and haemorrhage in patients undergoing chronic haemodialysis
Lancet (1996 b) 348 (9029): 764
65. Greinacher A., Janssens U., Berg G., Bock M., Kwasny H., Kemkes-Matthes B., Eichler P., Volpel H., Poetzsch B., Luz M.
Lepirudin (rekombinant hirudin) for parenteral anticoagulation in patients with heparin induced thrombocytopenia. Heparin-associated thrombocytopenia study (HAT) investigators.
Circulation (1999) 10; 100 (6): 587 - 593

66. Gruel Y., Lang M., Darnige L., Pacouret G., Dreyfus X., Charbonnier B.
Fatal effect of reexposure to heparin after previous heparin- associated thrombocytopenia and thrombosis
Lancet (1990) 336: 1077
67. Gruel Y., Rupin A., Darnige L., Moalic-Reverdiau P., Binet C., Bardos P., Leroy J.
Specific quantification of Heparin-dependent antibodies for the diagnosis of HAT using an enzyme-linked immunosorbent assay
Thrombosis Research (1991) 62: 377 - 387
68. Gruel Y., Rupin A., Watier H., Vigier S., Bardos P., Leroy J.
Anticardiolipin antibodies in heparin- associated thrombocytopenia
Thrombosis Research (1992) 67: 601 - 606
69. Gruel Y., Boizard-Boval B., Waultier J.L.
Further evidence that alpha-granule components such as platelet factor 4 are involved in platelet-IgG-heparin interactions during HAT
Thrombosis and Haemostasis (1993) 70: 375
70. Haas S., Haas P.
Niedermolekulare Heparine-Anwendung in Klinik und Praxis
Zeit-Verlag, Steinen, 1996
71. Hach-Wunderle V., Kainer K., Salzmann G., Müller-Berghaus G., Pötzsch B.
Heparin-related thrombosis despite normal platelet counts in vascular surgery
American Journal of Surgery (1997) 173: 117 - 119
72. Harenberg J.
Pharmacology of low molecular weight heparins
Seminars of Thrombosis and Hemostasis (1990) 16: 12 - 19

73. Harenberg J., Huhle G., Hoffmann U.,
Antithrombotische Therapie- Moderne therapeutische Ansätze
Internist (1999) 40 (8): 885 – 893
74. Horne M.K., Chao E.S.
Heparin binding to resting and activated platelets
Thrombosis Research (1989) 51: 135 - 144
75. Horne M.K., Chao E.S.
The effect of molecular weight on heparin binding to platelets
British Journal of Haematology (1990) 74: 306 - 312
76. Horsewood P., Warkentin T.E., Hayward C.P.M, Kelton J.G.
The epitopic specificity of HIT
British Journal of Haematology (1996) 95: 161 - 167
77. Howe D.M., Lynch D.M.
An enzyme-linked immunosorbent assay for the evaluation of thrombocytopenia induced by heparin
Journal of Laboratory and Clinical Medicine (1985) 554 - 559
78. Howell W.H., Holt E.
Two new factors in blood coagulation - heparin and pro - antithrombin
American Journal of Physiology (1918) 47: 328 - 341
79. Huhle G., Hoffmann U., Song X., Wang L.C., Heene D.L., Harenberg J.
Immunologic response to recombinant hirudin in HIT type II patients during long-term treatment
British Journal of Haematology (1999) 106: 195 – 201

80. Hull R., Hirsh J., Sackett D.L.
Combined use of leg scanning and impedance plethysmography in suspected Venous thrombosis: an alternative to venography
New England Journal of Medicine (1977) 296: 1497 - 1500

81. Hume M., Turner R.H., Kuriakose T.X., Surprenant J.
Venous thrombosis after total hip replacement
Journal of Bone and Joint Surgery (1976) 58A: 933

82. Huss B., Kretschmer V., Schnabel M., Weinel R., Ulshofer B.
Pseudothrombocytopenia: case reports and review of the literature
Infusionstherapie und Transfusionsmedizin (1995) 22 (5): 303 – 309

83. Janson J.I., Moake J.L., Capinitio G.
Aspirin prevents heparin-induced platelet aggregation in vivo
British Journal of Haematology (1983) 53: 166 - 168

84. Kakkar V.V. , Flank C., Howe C.T.
Natural history of postoperative deep vein thrombosis
Lancet (1969) 2: 230 – 233

85. Kakkar V.V., Djazaeri B., Fok J., Fletcher M., Scully M.F., Westwick J.
Low-molecular-weight heparin and prevention of postoperative deep vein thrombosis
British Medical Journal (1982) 284 (6313): 375 – 379

86. Kappers-Klunne M.C., Boon D.M., Hop W.C., Michiels J.J., Stibbe J., van der Zwaan C., Koudstaal P.J., van Vliet H.H.
HIT and thrombosis: a prospective analysis of the incidence in patients with heart and cerebrovascular diseases
British Journal of Haematology (1997) 96(3) 442 - 446

87. Kelton J.G., Sheridan D., Brain H., Powers P.J., Turpie A.G., Carter C.J.
Clinical usefulness of testing for a heparin-dependent platelet aggregating factor in patients with suspected HAT
Journal of Laboratory and Clinical Medicine (1984) 103: 606 - 612

88. Kelton, J.G.
HIT
Haemostasis (1986) 16:173- 186

89. Kelton J.G., Sheridan D.P., Santos A., Smith J., Steeves K., Smith C., Brown C., Murphy W.G.
HIT: laboratory studies
Blood (1988) 72: 925 – 930

90. Kelton J.G., Smith J.W., Warkentin T.E., Hayward C.P.M., Denomme G.A., Horsewood P.
Immunoglobulin G from patients with heparin induced thrombocytopenia binds to a complex of heparin and PF 4
Blood (1994) 83: 3232 - 3239

91. Kiefel V.
Differentialdiagnose der akuten Thrombozytopenie
Hämostaseologie (1999) 19: 30 – 41

92. Kikta M.J., Keller M.P., Humphrey P.W.
Can low molecular weight heparins be safely given to patients with HIT syndrome?
Surgery (1993) 114. 705 - 710

93. King D.J., Kelton J.G.
HAT
Annals of Internal Medicine (1984) 100: 535 - 400

94. Lee D.H., Warkentin T.E., Denomme G.A., Hayward P.M., Kelton J.G.
A diagnostic test for HIT: detection of platelet microparticles using flow cytometry
British Journal of Haematology (1996) 95: 724 - 731
95. Lee H.D., Warkentin T.E., Denomme G.A., Lagrotteria D.D., Kelton J.G.
Factor V Leiden and thrombotic complications in HIT
Thrombosis Haemostasis (1998) 79: 50 – 53
96. Lindahl U., Höök M.
Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules
Annual Reviews of Biochemistry (1978) 47: 385 - 417
97. Lindhoff-Last E., Eichler P., Stein M., Plagemann J., Gerdson F., Wagner R., Ehrly A.M., Bauersachs R.
A prospective study on the incidence and clinical relevance of heparin induced antibodies in patients after vascular surgery
Thrombosis Research (2000) 97 (6): 387 – 397
98. Look K.A., Sahud M., Flaherty S., Zehnder J.L.
Heparin-induced platelet aggregation versus platelet factor 4 enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of HIT-thrombosis
American Journal of Clinical Pathology (1997) 108: 78 - 82
99. Lynch D.M., Howe S.E.
HAT: antibody binding specificity to platelet antigens on platelets
Blood (1985) 66: 1176 – 1181
100. Magnani H.N.
HIT: an overview of 230 patients treated with Orgaran (Org 10172)
Thrombosis and Haemostasis (1993) 70: 554 - 561

101. Malcolm, J.D., Wigmore T.A., Steinbracher, U.P.
HAT: low frequency in 104 patients treated with heparin of intestinal mucosal origin
Canadian Medical Association Journal (1979) 120: 1086 - 1088

102. Mc Lean J.
The thromboplastic actin of cephalin
American Journal of Physiology 41: 250 - 257

103. Murray D.W.G., Jaques L.B., Perrett T.S., Best C.H.
Heparin and the thrombosis of veins following injury
Surgery (1937) 2: 163 - 187

104. Nelson J.C., Lerner R.G., Goldstein R., Cagin N.A.
HIT
Archives of Internal Medicine (1978) 138: 548 – 552

105. Newman P.M., Swanson R.L., Chong B.H.
HIT: IgG binding to PF4-heparin complexes in the fluid phase and cross-reactivity
with low molecular weight heparin and heparinoid
Thrombosis Haemostasis (1998) 80: 292 – 297

106. Nielsen J.I., Ostergaard P.
Chemistry of heparin and low molecular weight heparin
Acta Chirurgica Scandinavia, Suppl (1988) 543: 52 - 56

107. Pedersen-Bjergaard U., Andersen M., Hansen P.B.
Drug induced thrombocytopenia: clinical data on 309 cases and the effect of cortico-
steroid therapy
European Journal of Clinical Pharmacology (1997) 52: 183 - 189

108. Pfueller S.L., David R.
Different platelet specificities of heparin-dependent platelet aggregating factors in heparin-associated immune thrombocytopenia
British Journal of Haematology (1986) 4 (1): 149 - 159

109. Powers P.J., Carter C., Kelton J.G.
Studies on the frequency of HAT
Thrombosis Research (1984) 33: 439 - 443

110. Quick D., Towbridge A.
Heparin: applications and future prospects
Chest (1988) 5: 755 - 757

111. Rhodes G.R., Dixon, R.H., Silver D.
HIT with thrombotic and hemorrhagic manifestations
Surg Gynecol Obstetr (1973) 136: 409 - 416

112. Rosenberg R.D., Damus P.S.
The purification and mechanisms of actions of human antithrombin-heparin cofactor
Journal of Biology and Chemistry (1973) 248: 6490 - 6505

113. Schiele F., Vuillemot A., Kramarz P., Kieffer Y., Anfuenot T., Bernard Y., Bassend J.P.
Use of recombinant hirudin as antithrombotic treatment in patients with HIT
American Journal of Hematology (1995) 50: 20 - 25

114. Schwartz B.S.
Heparin: what is it? how does it work?
Clinical Cardiology (1990) 13: 12 - 15

115. Sheridan D., Carter D., Kelton J.G.
A diagnostic test for HIT
Blood (1986) 67: 27 – 30
116. Stamatakis J.D., Kakkar V.V., Lawrence D., Bentley P.G.
The origin of the thrombi in the deep veins of the lower limb: a venographic study
British Journal of Surgery (1978) 65 (7): 449 - 451
117. Stewart M.W., Etches W.S., Boshkov L.K., Gordon P.A.
HIT: An improved method of detection based on lumi-aggregometry
British Journal of Haematology (1995) 91: 173 - 177
118. Suh J.-S., Malik M.-I., Aster R.H., Visentin G.P.
Characterisation of humoral immune response in HIT
American Journal of Hematology (1997) 54: 196 - 201
119. Suh J.-S., Aster H.R., Visentin G.P.
Antibodies from patients with HIT/ thrombosis recognize different epitopes on heparin: PF4
Blood (1998) 91 (3): 916 - 922
120. Tardy B., Tardy-Poncet B., Zeni F., Comtet C., Reynaud J., Bertrand J.C.
Thrombocytopenia associated with low-molecular-weight heparin
Lancet (1991) 338: 1217
121. Towne J.B., Bernhard V.M., Hussey C.
White clot syndrome: peripheral vascular complications of heparin therapy.
Archives of Surgery (1979) 114: 372-377

122. Visentin G.P., Ford S.E., Scott J.P., Aster R.H.
Antibodies from Patients with HIT/ Thrombosis are specific for PF4 complexed with heparin bound to endothelial cells
Journal of Clinical Investigation (1994) 93: 81 – 88

123. Visentin G.P., Malik M., Cyganiak K.A., Aster R.H.
Patients with unfractionated heparin during open heart surgery are at high risk to form antibodies reactive with heparin:PF4 complexes
Journal of Laboratory and Clinical Medicine (1996) 128: 376 - 383

124. Vitoux J.F., Mathieu J.F., Roncato M., Fiessinger J.N., Aiach M.
HAT: Treatment with low molecular weight heparin
Thrombosis Haemostasis (1986) 55: 37 - 39

125. Wahl T.O., Lipschitz D.A., Stechschulte D.J.
Thrombocytopenia associated with anti-heparin antibody
Journal of the American Medical Association (1978) 240: 2560

126. Warkentin T.E.
HIT
Annual Reviews of Medicine (1989) 40: 31 - 44

127. Warkentin T.E., Kelton J.G.
HIT
Progress in Hemostasis and Thrombosis (1991) 10: 1 – 34

128. Warkentin T.E., Kelton J.G.
Interaction of heparin with platelets, including HIT, in Bounameaux H. (Editor): Low Molekular Weight Heparin in prophylaxis and therapy of thrombembolic diseases.
New York, NY, Dekker (1994 a), 75 - 127

129. Warkentin T.E., Hirte H.W., Anderson D.R., Wilson W.E.C., O'Connell G.J., Lo R.C.
Transient global amnesia associated with acute HIT
American Journal of Medicine (1994 b) 97: 489 - 491
130. Warkentin T.E., Levine M.N., Hirsh I., Horsewood P.
HIT in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin
New England Journal of Medicine (1995) 332 (20): 1330 - 1335
131. Warkentin T.E.
Danaparoid (Orgaran®) for the treatment of heparin induced thrombocytopenia (HIT)
and thrombosis: effects of in thrombin and cross-linked fibrin generation, and evaluation of the significance of in vitro cross-reactivity (XR) of danaparoid for HIT-IgG
Blood (1996 a) 88 (Suppl 1): 626 a
132. Warkentin T.E.
HIT: Ig-mediated platelet activation, platelet microparticle generation, and altered procoagulant/ anticoagulant balance in the pathogenesis of thrombosis and venous limb gangrene complicating HIT
Tranfusion Medicine Reviews (1996 b) 10: 249 - 258
133. Warkentin T.E.
Heparin-induced skin lesions
British Journal of Haematology (1996 c) 92: 494 - 497
134. Warkentin T.E., Elavathil L.J., Hayward C.P.M.
The Pathogenesis of venous limb gangrene associated with HIT
Annual of Internal Medicine (1997) 127: 804 - 812.
135. Warkentin T.E.
Clinical presentation of HIT
Seminars of Hematology (1998 a), Vol 35, No 4, Suppl 5: 9 - 16

136. Warkentin T.E.; Chong B.H.; Greinacher A.
HIT: towards consensus
Thrombosis Haemostasis (1998 b) 79: 1 - 7

137. Warkentin T.E., Sheppard J.A., Horsewood P., Simpson P.J., Moore J.C., Kelton J.G.
Impact of the patient population on the risk for HIT
Blood (2000) 96(5): 1703 – 1708

138. Ziporen L., Li Z.Q., Park K.S., Sabnekar P., Arepally G., Shoenfeld Y., Kieber-Emmons T., Cines D.B., Poncz M.
Defining an antigenic epitope on the platelet factor 4 associated with HIT
Blood (1998) 92: 3250 – 3259

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:

„Optimierte Labordiagnostik zum Nachweis einer
Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) Typ II“

im Zentrum der Inneren Medizin des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität,
Medizinische Klinik I, Schwerpunkt Angiologie,
unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. A.M. Ehrly
mit Unterstützung durch Frau Dr. med. E. Lindhoff-Last

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als 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.

Vorliegende Arbeit ist in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht worden:

British Journal of Haematology (2001) 113: 886 - 890

Frankfurt am Main, 06.08.2001

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Frank Gerdson
 Geburtsdatum: 5. September 1970
 Geburtsort: Oldenburg (Oldb.)
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

SCHULBILDUNG

77 – 81 Grundschole Donnerschwee, Oldenburg (Oldb.)
 81 – 83 Orientierungstufe Flötenteich, Oldenburg (Oldb.)
 83 – 90 Altes Gymnasium, Oldenburg (Oldb.)
 1990 Abitur

WEHRDIENST

10/ 90 – 09/ 92 Sanitätsdienst der Luftwaffe, Oldenburg (Oldb.)

STUDIUM

10/ 92 – 03/ 93 Volkswirtschaftslehre an der Wilhelms-Universität, Münster
 03/ 93 – 11/ 99 Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität,
 Frankfurt am Main
 06/ 04/ 95 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
 23/ 09/ 96 Erster Abschnitt (1. Staatsexamen)
 03/ 04/ 98 Zweiter Abschnitt (2. Staatsexamen)
 18/ 11/ 99 Dritter Abschnitt (3. Staatsexamen)

TÄTIGKEITEN ALS ARZT IM PRAKTIKUM

02/00 – 04/01 Abteilung für Onkologie und Hämatologie der Medizinischen
 Kern- und Poliklinik, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Ham-
 burg

05/01 – Zentrum der Inneren Medizin, Medizinische Klinik I, Klinikum
der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 10.02.2002